

---

# **BACHELORARBEIT**

---

Frau  
**Michele-Nadine Wagner**

**Nachweis von C-reaktivem Protein  
(CRP) als Test eines neuen  
Hydrogels zur  
Oberflächenfunktionalisierung  
von SAW-Biosensoren**

2014



# **BACHELORARBEIT**

---

## **Nachweis von C-reaktivem Protein (CRP) als Test eines neuen Hydrogels zur Oberflächenfunktionalisierung von SAW-Biosensoren**

Autorin:

**Michele-Nadine Wagner**

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI10w2

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

Dr. rer. nat. Kerstin Länge

Mittweida, August 2014



---

## Bibliografische Angaben

Wagner, Michele-Nadine: Nachweis von C-reaktivem Protein (CRP) als Test eines neuen Hydrogels zur Oberflächenfunktionalisierung von SAW-Biosensoren, 49 Seiten, 31 Abbildungen, 8 Tabellen, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Mathematik / Naturwissenschaften / Informatik

Bachelorarbeit, 2014

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Satz: L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X

## Referat

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Nachweis des C-reaktiven Proteins (CRP) mit HSA im Probenhintergrund. Dabei soll ein Assay basierend auf SAW-Sensoren gefunden werden, mit welchem der Entzündungsmarker CRP künftig quantitativ und kostengünstig in Humanserum nachgewiesen werden kann. Die Herausforderung liegt darin, eine analytischspezifische Erkennungsschicht zu finden, auf der keine unspezifische Proteinadsorption stattfindet, was zu falsch-positiven Signalen führen würde. Dabei soll das neue Hydrogel Silan-PEG-Biotin (SB-PEG) zur Oberflächenmodifikation verwendet werden, welches sich im Rahmen des vorangegangenen Praktikums „Eignung von Polymeren zur Herstellung von Biosensorchips“ bereits beim Nachweis von biotinyliertem Rinderserumalbumin (b-BSA) bewährt hat. Zudem konnte im Praktikum gezeigt werden, dass das SB-PEG ein schonenderes Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung in Bezug auf nutzbare Kunststoffe für einen Biosensorchip bietet. Daher soll mit dem neuen Hydrogel SB-PEG ein CRP-Assay als Test durchgeführt werden. Dabei wird untersucht, ob es möglich ist, mit diesem neuen Hydrogel SB-PEG den Entzündungsmarker CRP im physiologisch relevanten Bereich von 10 µg/ml (Schwellwert) nachzuweisen und von deutlich höheren Konzentrationen unterscheiden zu können. Da neben der Bindung von CRP an die Oberfläche die Abschirmung der Bindung von unpezifischen Fremdproteinen eine wichtige Rolle spielt, insbesondere in realen Medien (z. B. Serum), wird zudem die Abschirmung der Beschichtung gegen Adsorption von Fremdproteinen bei den einzelnen Modifikationsschritten der Oberflächenfunktionalisierung untersucht.



# I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	II
Tabellenverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Danksagung .....	V
1 Motivation und Zielstellung .....	1
2 Theoretische Grundlagen .....	3
2.1 Biosensoren .....	3
2.2 Aufbau und Messprinzip von SAW-Biosensoren .....	5
2.3 Oberflächenmodifikation von SAW-Biosensoren .....	7
2.3.1 Parylen C .....	7
2.3.2 Silanisierung .....	8
2.3.3 Hydrogel .....	8
2.3.4 Linker .....	9
2.3.5 Fängermolekül .....	9
2.4 C-reaktives Protein (CRP) .....	10
2.4.1 Eigenschaften, Struktur und Funktionen von CRP .....	10
2.4.2 Physiologische Bedeutung von CRP .....	11
2.4.3 Nachweismethoden von CRP .....	11
3 Material und Methoden .....	13
3.1 Chemikalienliste .....	13
3.2 Puffer und Proteinlösungen .....	13
3.3 Versuchsaufbau SAW-Biosensor-Messplatz .....	14
3.3.1 Übersicht .....	14
3.3.2 Das FIA-System .....	15
3.3.3 Der SAW-Sensor .....	16
3.3.4 Die Flusszelle .....	17
3.4 Beschichtung der SAW-Sensoren .....	18

3.4.1 Beschichtung mit SB-PEG .....	18
3.4.2 Immobilisierung von Streptavidin als Linker .....	18
3.4.3 Immobilisierung von b-anti-CRP als Fängermolekül .....	18
3.5 Messungen mit dem SAW-Biosensor .....	19
3.5.1 Nullprobe .....	19
3.5.2 Immobilisierung von Streptavidin als Linker .....	19
3.5.3 Immobilisierung von b-anti-CRP .....	19
3.5.4 Unspezifische Bindung von HSA.....	20
3.5.5 Assay mit CRP auf immobilisiertem b-anti-CRP .....	20
3.6 Datenauswertung .....	22
4 Ergebnisse und Diskussion .....	25
4.1 Vorversuch zum neuen Hydrogel SB-PEG .....	25
4.2 Abschirmung der Sensorbeschichtungen aus den Zwischenschritten bei der Oberflächenfunktionalisierung gegen unspezifische Adsorption von HSA .....	27
4.2.1 Referenzmessung: HSA auf Parylen C .....	27
4.2.2 HSA auf Parylen C + SB-PEG .....	28
4.2.3 HSA auf Parylen C + SB-PEG + Streptavidin .....	29
4.2.4 HSA auf Parylen C + SB-PEG + Streptavidin + b-anti-CRP .....	29
4.2.5 Vergleich der Sensorbeschichtungen aus den Zwischenschritten bei der Oberflächenfunktionalisierung gegen unspezifische Adsorption von HSA .....	30
4.3 CRP-Assay .....	32
4.3.1 Streptavidin (Linker) und b-anti-CRP (Fängermolekül) .....	32
4.3.2 Erster CRP-Assay .....	34
4.3.3 Zweiter CRP-Assay .....	36
4.3.4 Dritter CRP-Assay .....	38
4.3.5 Vierter CRP-Assay.....	39
4.3.6 Vergleich .....	41
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	43
5.1 Zusammenfassung .....	43
5.2 Ausblick.....	43
Literaturverzeichnis .....	45



## II. Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematischer Aufbau eines Biosensors. ....	3
2.2	Modell des piezoelektrischen Effekts [Arnau, 2008]. ....	5
2.3	Schematischer Aufbau eines SAW-Biosensors (sensitiver Bereich) [Gruhl, 2010]. ....	6
2.4	Schematische Anordnung der IDT-Strukturen bei einem Resonator [Rapp, 2009]. ....	6
2.5	Schematische Darstellung der schrittweisen Oberflächenfunktionalisierung des SAW Bauteils [Gruhl, 2010]. ....	7
2.6	Allgemeine Strukturformel von Parylen C. ....	7
2.7	Schematischer Aufbau eines Antigen-Antikörper-Komplexes ....	9
2.8	a: Pentamerische Struktur von CRP; Calcium-Ionen sind als pinkfarbene Kreise dargestellt; b: Struktur des Typ I Protomers von CRP mit Calcium-Ionen [Shrive et al.; 1996] ....	10
3.1	Versuchsaufbau des Messplatzes ....	14
3.2	Schematischer Aufbau eines FIA-Systems, bestehend aus: Peristaltikpumpe 1 und 2, Injektionsventil mit Probenschleife, Probe und Detektor; nach [Rapp, 2009]. ....	15
3.3	SAW-Sensor Typ SR062 mit dem Bereich der IDTs in 200facher Vergrößerung (Vergrößerung von [Ngongang, 2012]). ....	16
3.4	Sensorgehäuse in Form einer Flusszelle, Ansicht der geschlossenen (links) und geöffneten (rechts) Flusszelle. ....	17
3.5	Kurvenverlauf der gesamten Messung ....	22
3.6	Messung aus Abbildung 3.5 nach Zeitkorrektur. ....	23
3.7	Messung nach Zeit- und Offset-Korrektur ....	23
3.8	Messung aus Abbildung 3.7 nach Driftkorrektur ....	24
4.1	Vergleich der Signalthöhe von BSA mit b-BSA auf Streptavidin-funktionalisierter SAW-Biosensoroberfläche mit AB-PEG oder SB-PEG als Hydrogel-Zwischenschicht. ....	25
4.2	HSA-Adsorption auf Parylen C ....	27
4.3	HSA-Adsorption auf Parylen C + SB-PEG ....	28
4.4	HSA-Adsorption auf Parylen C + SB-PEG + Streptavidin ....	29
4.5	HSA-Adsorption auf Parylen C + SB-PEG + Streptavidin + b-anti-CRP ....	30

4.6	Abschirmung der Sensorbeschichtungen aus den Zwischenschritten bei der Oberflächenfunktionalisierung gegen unspezifische Adsorption von HSA ( $n = 3$ ).....	31
4.7	Immobilisierung von Streptavidin (Linker) .....	33
4.8	Immobilisierung von b-anti-CRP (Fängermolekül) .....	33
4.9	CRP-Kurvenverläufe aus dem ersten CRP-Assay .....	35
4.10	Erster CRP-Assay .....	36
4.11	CRP-Kurvenverläufe aus dem zweiten CRP-Assay .....	37
4.12	Zweiter CRP-Assay.....	37
4.13	Dritter CRP-Assay .....	39
4.14	CRP-Kurvenverläufe aus dem vierten CRP-Assay .....	40
4.15	Vierter CRP-Assay .....	40

---

## III. Tabellenverzeichnis

3.1 Chemikalienliste.....	13
3.2 Zeitlicher Ablauf: Nullprobe.....	19
3.3 Zeitlicher Ablauf: Immobilisierung von Streptavidin als Linker.....	19
3.4 Zeitlicher Ablauf: Immobilisierung von b-anti-CRP.....	20
3.5 Zeitlicher Ablauf: Unspezifische Bindung von HSA.....	20
3.6 Zeitlicher Ablauf: Assay mit CRP auf immobilisiertem b-anti-CRP.....	21
3.7 Zeitlicher Ablauf: b-BSA Assays.....	22
4.1 Konzentrationen der verwendeten Immobilisierungsreagenzien und Proben für den jeweiligen CRP-Assay.....	32



## IV. Abkürzungsverzeichnis

AB-PEG .....	Amin-Polyethylenglykol-Biotin, Seite 8
b-anti-CRP .....	anti-CRP, biotinyliert, Seite 9
b-BSA .....	biotinyliertes Rinderserumalbumin, engl. biotinylated bovine serum albumin, Seite 8
BSA .....	Rinderserumalbumin, engl. bovine serum albumin, Seite 25
CRP .....	C-reaktives Protein, Seite 1
DC-PEG .....	Dicarboxy-Polyethylenglykol, Seite 8
DNA .....	Desoxyribonukleinsäure, engl. desoxyribonucleic acid, Seite 3
ELISA .....	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, engl. enzyme-linked immunosorbent assay , Seite 11
FIA-System .....	Fließ-Injektions-Analyse-System, Seite 15
GOPTS .....	3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan, Seite 8
HSA .....	Humanserumalbumin, engl. human serum albumin, Seite 13
IDT .....	Interdigitaltransduktor, engl. interdigital transducer, Seite 5
PBS .....	phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl. phosphate buffered saline, Seite 13
QCM .....	Quarzkristallmikrowaage, engl. quartz crystal microbalance, Seite 4
SAW .....	akustische Oberflächenwelle, engl. surface acoustic wave, Seite 1
SB-PEG .....	Silan-Polyethylenglykol-Biotin, Seite 8



## V. Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Dr. Kerstin Länge für ihre freundliche Art, fachkompetente Betreuung während der Bachelorarbeit, sowie für die Möglichkeit, ein so spannendes Thema am Institut für Mikrostrukturtechnik bearbeiten zu dürfen. Sie stand mir immer mit Anregung und Ratschlägen hilfreich zur Seite.

Allen meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe „Biofunktionalisierung“ danke ich für ihre Unterstützung mit Rat und Tat, sowie für das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Professor Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers von der Hochschule Mittweida danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Bachelorarbeit.

Außerdem möchte ich meiner Familie für ihre ständige Unterstützung und ihre entgegengebrachte Geduld einen ganz herzlichen Dank aussprechen.





# 1 Motivation und Zielstellung

Ziel der Arbeit ist es, mit Hilfe eines am Karlsruher Institut für Technologie entwickelten Biosensorsystems basierend auf akustischen Oberflächenwellen (engl. surface acoustic wave, SAW), das C-reaktive Protein (CRP) in menschlichem Blutserum nachzuweisen. Der Nachweis von CRP mit HSA im Probenhintergrund spielt eine wichtige Rolle in der Diagnostik, da es sich bei CRP um ein positives Akutphasenprotein handelt, dessen Konzentration im Blut während der akuten Phase einer Entzündung bzw. einer bakteriellen Infektion um das 1000-fache zur Normalkonzentration (1-10 µg/ml) erhöht ist [Gabay & Kushner, 1999; Matern, 2009]. Zudem können geringere Erhöhungen der CRP-Konzentration beispielsweise auf ein erhöhtes Herzinfarktrisiko hinweisen [Ridker et al., 1998].

Die Herausforderung beim Nachweis von CRP mit einem massesensitiven Biosensor liegt in erster Linie an der Anzahl von Fremdproteinen im Humanserum (60-80 mg/ml), da die Adsorption von unspezifischen Proteinen das gemessene Sensorsignal falsch-positiv beeinflussen könnte. Daher soll ausgehend vom Praktikum „Eignung von Polymeren zur Herstellung von Biosensorchips“ [Wagner, 2014] ein neues Hydrogel (SB-PEG) zur Sensorbeschichtung verwendet werden, da im Praktikum bereits gezeigt werden konnte, dass das neue Hydrogel (SB-PEG) gut gegen unspezifische Fremdproteine abschirmt und somit einen guten Ausgangspunkt liefert in Hinblick auf die Abschirmung vor Fremdproteinen in Humanserum. Zudem konnte im Praktikum gezeigt werden, dass das SB-PEG ein schonderes Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung in Bezug auf verwendbare Kunststoffe für einen Biosensorchip darstellt. Daher wird mit dem neuen Hydrogel SB-PEG, als diagnostisch relevantes Beispiel, ein CRP-Assay durchgeführt. Dabei muss die Konzentration des Entzündungsmarkers möglichst im physiologisch relevanten Konzentrationsbereich von 10 µg/ml liegen.



## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Biosensoren

Der Bedarf an biosensorischen Messmethoden ist in den vergangenen Jahren stetig gestiegen, da Biosensoren meist kostengünstig sind und schnelle Ergebnisse liefern [Bogue, 2005; Rapp, 2009]. Primäre Anwendungsgebiete sind Lebensmittel- und Umweltanalytik, Prozesskontrolle und klinische Diagnostik [Rapp et al., 2010]. Es werden unterschiedliche Analyte nachgewiesen, wie Stoffwechselprodukte, z. B. Blutzucker oder Cholesterin, DNA (engl. desoxyribonucleic acid) zur Bestimmung und Identifikation von Erbkrankheiten, toxische Verbindungen in Trinkwasser, wie z. B. Pestizide oder auch Rohstoffe und Endprodukte zur Qualitätskontrolle [Rapp, 2009].

Ein Biosensor vereint einen Transduktor mit einer sensitiven Erkennungsstruktur. Dadurch ist er in der Lage, eine biochemische Änderung auf der Transduktoroberfläche sofort in ein messbares Signal zu überführen (Abb. 2.1) [Gruhl et al., 2013].

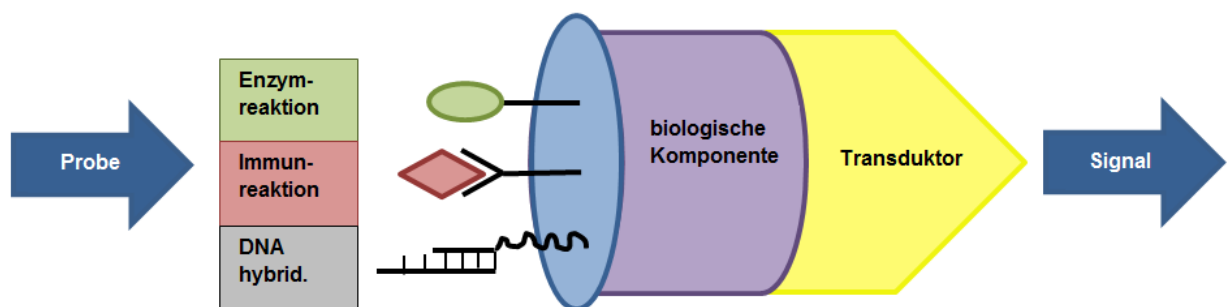


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Biosensors.

Welcher Biosensor gewählt wird, ist abhängig von der analytischen Anforderung bezüglich Spezifität, Reproduzierbarkeit, Sensitivität, Stabilität und der Akzeptanz der Anwender [Gruhl, 2010]. Die Qualität der biologischen Erkennungsstruktur limitiert die Selektivität und die Spezifität. Die Sensitivität wird über die Wahl des Transduktors bestimmt [Rapp et al., 2010]. Je nach Bedarf können unterschiedliche Transduktorprinzipien eingesetzt werden. Dazu gehören Transduktoren, die elektrochemische, optische, akustische, thermische und magnetische Signale verarbeiten können [Gruhl et al., 2013]. Die drei wichtigsten Transduktorprinzipien werden nachfolgend kurz erläutert:

### 1) Elektrochemische Transduktoren

Die elektrochemischen Biosensoren können in drei Hauptkategorien unterteilt werden: amperometrische, potentiometrische und impedimetrische Biosensoren. Alle drei nutzen in der Regel Redoxreaktionen aus, die auf den Elektrodenoberflächen des Transduktors ablaufen [Gruhl et al., 2013].

### 2) Optische Transduktoren

Diese Transduktoren beruhen beispielsweise auf der Oberflächenplasmonenresonanz (engl. surface plasmon resonance), der reflektrometrischen Interferenzspektroskopie oder der Messung von Chemolumineszenz oder Fluoreszenz spezieller Marker [Gruhl, 2010].

### 3) Akustische Transduktoren

Akustische Transduktoren, wie massesensitive bzw. gravimetrische Transduktoren, nutzen mechanisch erzeugte akustische Wellen, z. B. Oberflächenwellen. Dabei werden z. B. Änderungen der Schallgeschwindigkeit der akustischen Oberflächenwelle, resultierend aus der Masseänderung durch Anbindung von Analyten an der Sensoroberfläche, mittels dabei entstehender Frequenzänderung gemessen. Zu den akustischen Transduktoren gehören die Quarzkristallmikrowaagen (engl. quartz crystal microbalance, QCM), die Cantilever und die Sensoren basierend auf akustischen Oberflächenwellen (engl. surface acoustic wave, SAW) [Gruhl, 2010; Gruhl et al., 2013]

## 2.2 Aufbau und Messprinzip von SAW-Biosensoren

Das Messprinzip der SAW-Biosensoren beruht auf dem piezoelektrischen Effekt (Abb. 2.2). Dieser Effekt wurde im Jahr 1880 durch die Brüder Jacques und Pierre Curie an natürlichen Kristallen entdeckt [Curie & Curie, 1880].

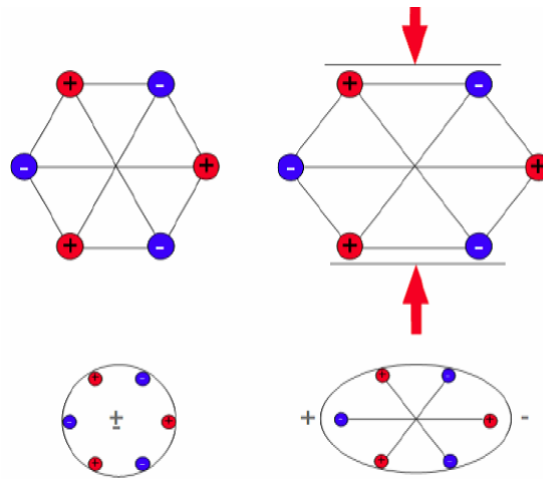


Abbildung 2.2: Modell des piezoelektrischen Effekts [Arnau, 2008].

Durch Einwirkung von äußeren Kräften oder Drücken wird der Kristall verformt. Dabei kommt es zu Verschiebung der positiven und negativen Ladungsschwerpunkte, die dann nicht mehr zusammenfallen und somit zu einer messbaren elektrischen Spannung an der Oberfläche des Kristalls führen. Dieser Effekt ist auch umkehrbar, man erhält den sogenannten inversen piezoelektrischen Effekt. Hier kommt es durch Anlegen einer elektrischen Spannung zu einer Verschiebung der Ladungsschwerpunkte und somit zur mechanischen Verformung des Kristalls [Rapp, 2009]. Mit Hilfe des inversen piezoelektrischen Effekts wird beim SAW-Biosensor eine horizontale Oberflächenschwelle erzeugt. Dabei handelt es sich um Schallwellen, die nicht in das Substrat eindringen, sondern sich an der Oberfläche eines Festkörpers ausbreiten [Länge et al., 2008].

Die meisten SAW-Bauteile für Biosensoren bestehen aus dem piezoelektrischen Substrat Lithiumtantalat ( $\text{LiTaO}_3$ ), Lithiumniobat ( $\text{LiNbO}_3$ ) oder Quarz ( $\text{SiO}_2$ ). Auf dieses Substrat werden kammartige Interdigitaltransduktoren (engl. interdigital transducer, IDT) aus Gold aufgebracht (Abb. 2.3). Am Sende-IDT wird eine elektrische hochfrequente Wechselspannung angelegt. Auf dem piezoelektrischen Substrat wird so eine zur Spannung gleichphasige, wechselnde Deformation im Gitter des Piezokristalls erzeugt und damit eine anhaltende akustische Welle. Diese Welle läuft über das Substrat, wird vom Empfangs-IDT aufgefangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Zwischen den IDTs liegt der sensitive Bereich. Vor allem in diesem Bereich können Änderungen

der Welle auf der Oberfläche gemessen werden. Das heißt, Analytmoleküle, die auf der Oberfläche des Sensors binden, erzeugen Änderungen der lokalen Schallgeschwindigkeit, welche dann durch die Änderung der Resonanzfrequenz gemessen werden können. Je größer die Massezunahme auf dem Sensor, desto größer die Frequenzänderung [Gruhl, 2010; Rapp, 2009].

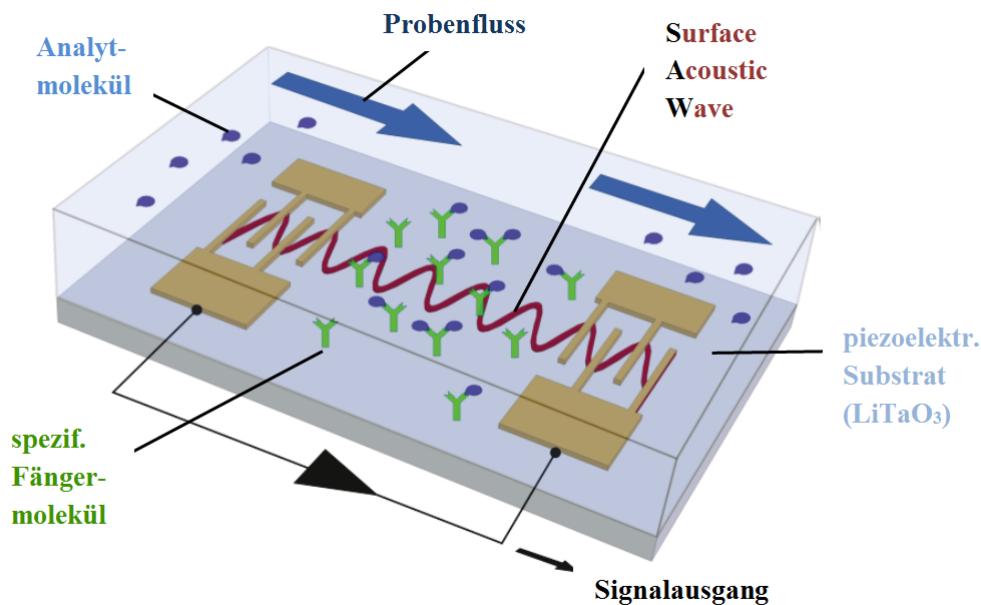


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau eines SAW-Biosensors (sensitiver Bereich) [Gruhl, 2010].

Das in dieser Arbeit verwendete Bauteil ist ein Resonator. Bei einem Resonator liegen Sende- und Empfangs-IDT nah beieinander, eingeschlossen durch eine große Zahl von sogenannten Reflektorfingern, die die gleiche Periodizität wie die IDTs besitzen (Abb.2.4). Durch Vielfachreflexion erzeugen diese Reflektorfinger eine stehende Welle, welche durch die große Zahl an Fingern stark frequenzelektierend ist. Dadurch ergibt sich ein scharfes Übertragungsband [Rapp, 2009]. Dies bietet den Vorteil, dass die Resonanzfrequenz mit einem Oszillator gemessen werden kann, der schnell und kostengünstig ist.

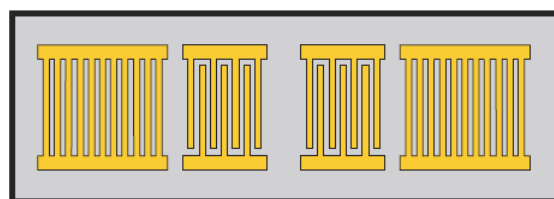


Abbildung 2.4: Schematische Anordnung der IDT-Strukturen bei einem Resonator [Rapp, 2009].

## 2.3 Oberflächenmodifikation von SAW-Biosensoren

Damit die Sensorbauteile für die Biosensorik verwendet werden können, ist eine Modifikation der Oberfläche mit einer biosensitiven Erkennungsschicht erforderlich, wie in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt [Gruhl, 2010].

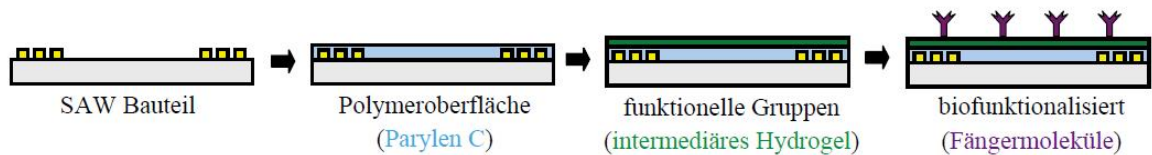


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der schrittweisen Oberflächenfunktionalisierung des SAW Bauteils [Gruhl, 2010].

### 2.3.1 Parylen C

Am Anfang eine Polymerschicht auf die SAW-Sensoroberfläche aufzubringen bietet den Vorteil der Bereitstellung einer chemisch homogenen Oberfläche. Dies erhöht das Gelingen und die Reproduzierbarkeit weiterer Modifikationsschritte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Beschichtungen mit Parylen C (Poly(2-chlor-p-xylylen)) (Abb. 2.6) verwendet, die durch eine chemische Gasabscheidung des Dimers (Di(2-chlor-p-xylylen)) bei Raumtemperatur auf den Sensor aufgebracht wurden. Diese Art der Beschichtung erzeugt eine sehr gleichmäßige und nicht poröse dünne Schicht mit guter Haftung auf dem Substrat [Länge et al., 2003; Rapp, 2009].

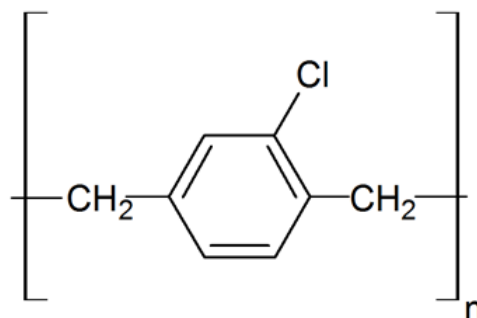


Abbildung 2.6: Allgemeine Strukturformel von Parylen C.

### 2.3.2 Silanisierung

Unter Silanisierung versteht man die Anbindung einer Silanschicht auf einer Oberfläche. Diese Schicht dient zur Einführung funktioneller Gruppen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird zuvor die Parylen C-Schicht im Niederdruckplasma aktiviert. Dadurch entstehen freie Radikale an der Oberfläche, die mit Sauerstoff reagieren. Durch diese Reaktion entstehen u. a. aktive Hydroxy- und Carboxygruppen auf der oxidierten Oberfläche. Eine Kopplung mit einem Silan an diese aktiven Gruppen, vor allem an die OH-Gruppen, ist nun möglich [Gruhl, 2010].

### 2.3.3 Hydrogel

Die Ankopplung eines Hydrogels auf der Sensoroberfläche wird in erster Linie zur Abschirmung unspezifischer Bindungen von Fremdproteinen in komplexen Medien benötigt. Dies ist wichtig im Hinblick auf Anwendungen z. B. in der medizinischen Diagnostik, da hier meist Blutserum untersucht wird. Bei anschließenden Modifikationsschritten ermöglicht das Hydrogel schonendere Reaktionsbedingungen, so dass die Biomoleküle (Fängermoleküle) ihre physiologische Struktur und ihre Funktionalität [Rapp et al., 2010] für die analytspezifische Bindung beibehalten.

Als Hydrogel wird im Rahmen dieser Arbeit das Hydrogel Silan-PEG-Biotin (SB-PEG) verwendet. Das SB-PEG wird direkt an die freien OH-Gruppen des aktivierten Parylen C gebunden und stellt als funktionelle Gruppe Biotin zur weiteren Kopplung mit einem Linker bereit.

#### **Vorteil des Hydrogels SB-PEG im Vergleich zu den bisher verwendeten Hydrogelen**

Das SB-PEG ist in Bezug auf SAW-Sensoren ein neu verwendetes Hydrogel, welches sich bereits bei dem Nachweis von biotinyliertem BSA (b-BSA) bewährt hat (s. Praktikumsbericht „Eignung von Polymeren zur Herstellung von Biosensorchips“; [Wagner, 2014]). In bisherigen Arbeiten verwendete Hydrogele (z. B. Amin-PEG-Biotin (AB-PEG), Dicarboxy-PEG (DC-PEG) [Matern, 2009; Detjens 2012]) benötigen zur Ankopplung an die freien OH-Gruppen des Parylen C ein Silan als Zwischenschicht (meist 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan, kurz GOPTS). Das SB-PEG bietet den Vorteil, dass es die Silangruppen zur Anbindung an die Oberfläche bereits besitzt. Somit kann das Beschichtungsprotokoll um den Silanisierungsschritt (s. Abschnitt 2.3.2) verkürzt werden. Das heißt, die SAW-Bauteile stehen nach der Beschichtung schneller zur Verwendung bereit. Zudem bietet das SB-PEG ein schonenderes Verfahren zur Beschichtung im Hinblick auf verwendbarer Kunststoffe für Biosensorchips.



### 2.3.4 Linker

Um ein biotinyliertes Fängermolekül (hier: biotinylierter Antikörper) binden zu können, ist ein Linker erforderlich. Dazu wird häufig Streptavidin eingesetzt, welches vier freie Bindungsstellen zur Anbindung von Biotin-Gruppen besitzt. Diese Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine affine Bindung und ist aufgrund ihrer extrem hohen Affinitätskonstante sehr stabil [Bar2000].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Linker Streptavidin, das den biotinylierter Antikörper b-anti-CRP binden kann, verwendet.

### 2.3.5 Fängermolekül

Um einen Analyten spezifisch nachweisen zu können, ist es erforderlich, dass analytspezifische Fängermoleküle auf der Sensoroberfläche gekoppelt werden. Dabei wird meist ein biotinylierter Antikörper verwendet, da dadurch die Bindung an den Linker gerichtet ist, wodurch gewährleistet ist, dass die Bindungsstellen für den Analyten frei bleiben. Zudem macht sich der Antikörper einen Antigen-Antikörper-Komplex (Abb. 2.7) zu Nutze, bei dem die Reaktionspartner über eine nicht-kovalente Bindung miteinander in enge Wechselwirkung treten.

Als Fängermolekül wird in dieser Arbeit der Antikörper b-anti-CRP eingesetzt und als nachzuweisender Analyt CRP.

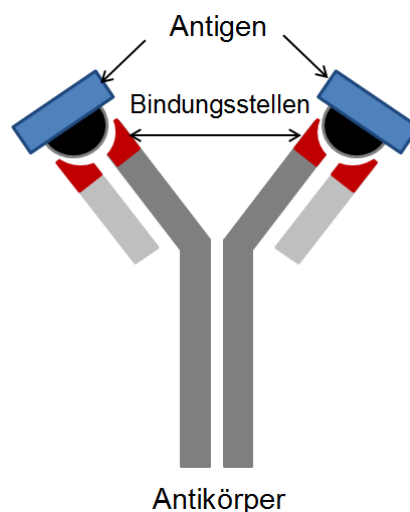


Abbildung 2.7: Schematischer Aufbau eines Antigen-Antikörper-Komplexes

## 2.4 C-reaktives Protein (CRP)

### 2.4.1 Eigenschaften, Struktur und Funktionen von CRP

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Entzündungsmarker und gehört zu der phylogenetisch ältesten und hoch konservierten 'Pentraxin' Proteinfamilie. Das CRP ist ein Akutphasenprotein, welches einen schnellen und starken Anstieg der Serumkonzentration als Reaktion auf eine Infektion oder Gewebsverletzung zeigt [Volanakis, 2001]. Das CRP besitzt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige spezifische Bindung für Phosphocholin, das Bestandteil vieler Bakterien- und Pilz-Polysaccharide, sowie der meisten biologischen Zellmembranen ist [Volanakis, 2001; Volanakis & Kaplan, 1971]. Erstmals wurde das C-reaktive Protein 1930 von Tillet und Francis beschrieben [Tillet & Francis, 1930]. Seine Namensgebung *capsular reactive protein* erhielt es dank der Eigenschaft, durch eine Reaktion mit dem C-Polysaccharid von Pneumokokken eine Bindung einzugehen [Volanakis, 2001].

Die Struktur von CRP (Abb. 2.8) wurde durch Röntgenkristallografie bestimmt. Das CRP besteht aus fünf nicht-kovalent verbundenen Protomeren, die symmetrisch um eine Zentralpore angeordnet sind. Die Gesamtabmessung des CRP Pentamers beträgt 10,2 nm mit einer Zentralpore von 3,0 nm und einem Protomerdurchmesser von 3,6 nm [Lee et al., 2008]. Ein Protomer besteht aus 206 Aminosäuren, gefaltet in zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblattstrukturen mit einer abgeflachten spiralförmigen Topologie [Volanakis, 2001]. Die Molekülmasse jedes Protomers beträgt ca. 24 kDa. Daraus ergibt sich eine Gesamtmolekülmasse von ca. 118 kDa [Shrive et al., 1996].

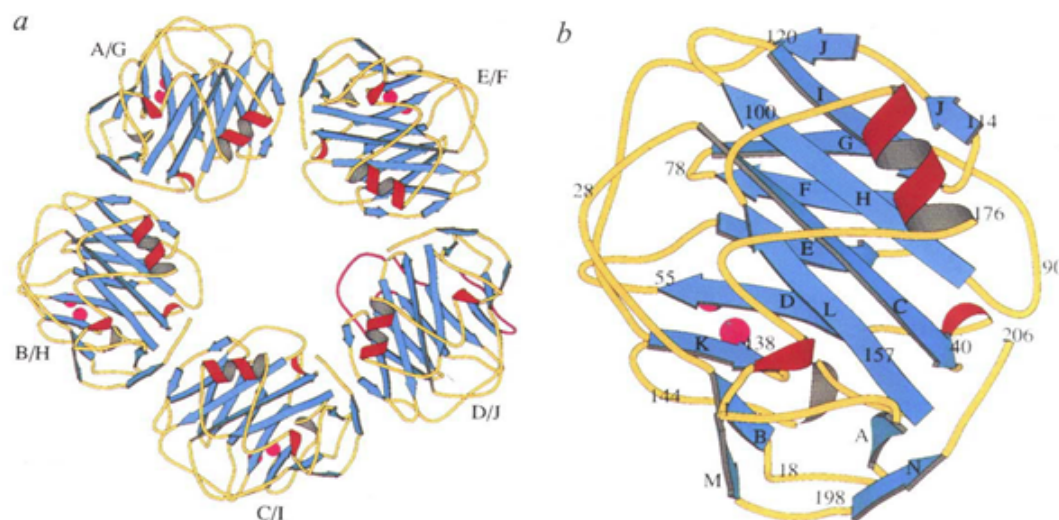


Abbildung 2.8: a: Pentamerische Struktur von CRP; Calcium-Ionen sind als pinkfarbene Kreise dargestellt; b: Struktur des Typ I Protomers von CRP mit Calcium-Ionen [Shrive et al., 1996]

Die wichtigste biologische Funktion von CRP ist die Fähigkeit, Krankheitserreger und beschädigte Zellen des Wirts zu erkennen und Abwehrmechanismen in Gang zu setzen [Volanakis, 2001]. Im Rahmen von Gewebeschädigungen tritt das CRP als Teil einer unspezifischen Immunreaktion vermehrt im Blut auf. Zudem gehört das CRP zu den Opsoninen, die das Komplementsystem aktivieren. Dabei lagert sich das CRP an Bakterien und Membranbestandteile zerstörter Körperzellen an und wird dann von Makrophagen, die Rezeptoren für CRP besitzen, erkannt [URL-1].

### **2.4.2 Physiologische Bedeutung von CRP**

Bei einem gesunden Menschen liegt die CRP-Konzentration im Blutserum in einem Bereich zwischen 1-10 µg/ml [Gabay & Kushner, 1999; Albrecht et al., 2008].

Wie in Abschnitt 2.4.1 bereits beschrieben, gehört das CRP zu den Akutphasenproteinen, dessen Konzentration im menschlichen Blut während der akuten Phase (z. B. Entzündung) um das 1000-fache ansteigt. Dieser Anstieg der Konzentration kann dabei helfen zu unterscheiden, ob es sich bei einem Patienten um eine entzündlich oder nicht entzündlich verlaufende Krankheit handelt. Zudem kann die CRP-Konzentration Aufschluss darüber geben, ob es sich um eine virale oder bakterielle Infektion handelt.

Leicht erhöhte CRP-Konzentrationen von > 6 µg/ml stehen häufig im Zusammenhang mit einem erhöhtem Herzinfarktrisiko oder einer Gefäßerkrankung [Gabay & Kushner, 1999].

### **2.4.3 Nachweismethoden von CRP**

In klinischen Laboratorien wird die CRP-Konzentration routinemäßig über einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ermittelt. Diese Art der Bestimmung gilt als eine hoch sensitive Methode. Geeignete Methoden, die diese Analysen automatisiert durchführen können, sind nur in gut ausgestatteten Laboren möglich und machen so Einzeltests teuer. In der Notfalldiagnostik, sowie bei Patienten, die aus gesundheitlichen Gründen ihre CRP-Konzentration bestimmen müssen, werden häufig Teststreifen aus speziellen Test-Kits verwendet, die ein schnelles Ergebnis versprechen. Diese liefern allerdings nur eine semiquantitative Aussage, da sie den CRP-Spiegel nur in Konzentrationsbereiche durch eine Farbreaktion angeben können (z. B. „CRP-Schnelltest“ von der Firma IMACO GmbH, drei Konzentrationsbereiche: < 5; 5-10; > 10 mg/ml) [Albrecht et al., 2008; URL-2].



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalienliste

In Tabelle 3.1 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sowie ihre Hersteller aufgelistet.

Chemikalie	Abkürzung	Hersteller	Bestellnummer
anti-CRP, biotinyliert	b-anti-CRP	ICL LAB	GCRP-80B
Biotin-CONH-PEG-Si(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	SB-PEG	Rapp Polymere	13 3000-25-71
C-reaktives Protein	CRP	Biotrend	CRP15-N-100
Human serum albumin	HSA	Calbiochem	126658
Phosphate buffered saline	PBS	Sigma-Aldrich	P4417-100TAB
Streptavidin		Rockland	S000-01

Tabelle 3.1: Chemikalienliste

### 3.2 Puffer und Proteinlösungen

Als Trägerstrom und Probenhintergrund wurde eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline, PBS) verwendet. Dieser Puffer liegt zunächst als Tablette vor und wird nach Herstellerangaben gelöst. Mit einer Tablette erhält man 200 ml Puffer.

Als Proteine wurden b-anti-CRP, CRP, HSA sowie Streptavidin verwendet.

Das b-anti-CRP lag bereits in einer gepufferten Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml vor und wurde mit PBS zu einer Konzentration von 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml verdünnt (Details s. Abschnitt 4.3, Tab. 4.1). Das Probenvolumen lag jeweils bei 250 µl.

Für das CRP wurde eine Stammlösung angesetzt mit 100 µg Lyophilisat (CRP) und 500 µl bidestilliertem Wasser, was eine Konzentration von 200 µg/ml ergab. Damit wurden 3 Aliquots mit je 150 µl erstellt und bis zur Verwendung eingefroren. Später wurde je ein Aliquot für eine Verdünnungsreihe (0/1/10/100 µg/ml) verwendet, mit HSA ( $c = 1$  mg/ml) als Hintergrund. Zudem wurden zwei weitere CRP-Stammlösungen verwendet. Diese dienten ebenfalls für eine Verdünnungsreihe (0/1/10/100 µg/ml) mit HSA ( $c = 1$

mg/ml) als Hintergrund. Die eine CRP-Stammlösung mit einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml wurde zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml mit HSA ( $c = 1$  mg/ml) als Hintergrund verdünnt. Die zweite CRP-Stammlösung hatte dann eine Konzentration von 100 µg/ml und wurde mit HSA ( $c = 1$  mg/ml) als Hintergrund zu den Konzentrationen 10 µg/ml und 1 µg/ml verdünnt. Das Probenvolumen lag jeweils bei 250 µl

Das HSA lag als Lyophilisat vor und wurde mit PBS zu einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml verdünnt. Das Probenvolumen lag jeweils bei 250 µl.

Das Streptavidin lag tiefgekühlt als Aliquots der Konzentration 25 µg/10 µl vor und wurde mit 240 µl PBS verdünnt zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml oder mit 490 µl zu einer Endkonzentration 0,05 µg/ml (Details s. Abschnitt 4.3, Tab. 4.1). Das Probenvolumen lag jeweils bei 250 µl.

### 3.3 Versuchsaufbau SAW-Biosensor-Messplatz

#### 3.3.1 Übersicht

Der Versuchsaufbau zur SAW-Biosensorik ist in Abbildung 3.1 veranschaulicht.

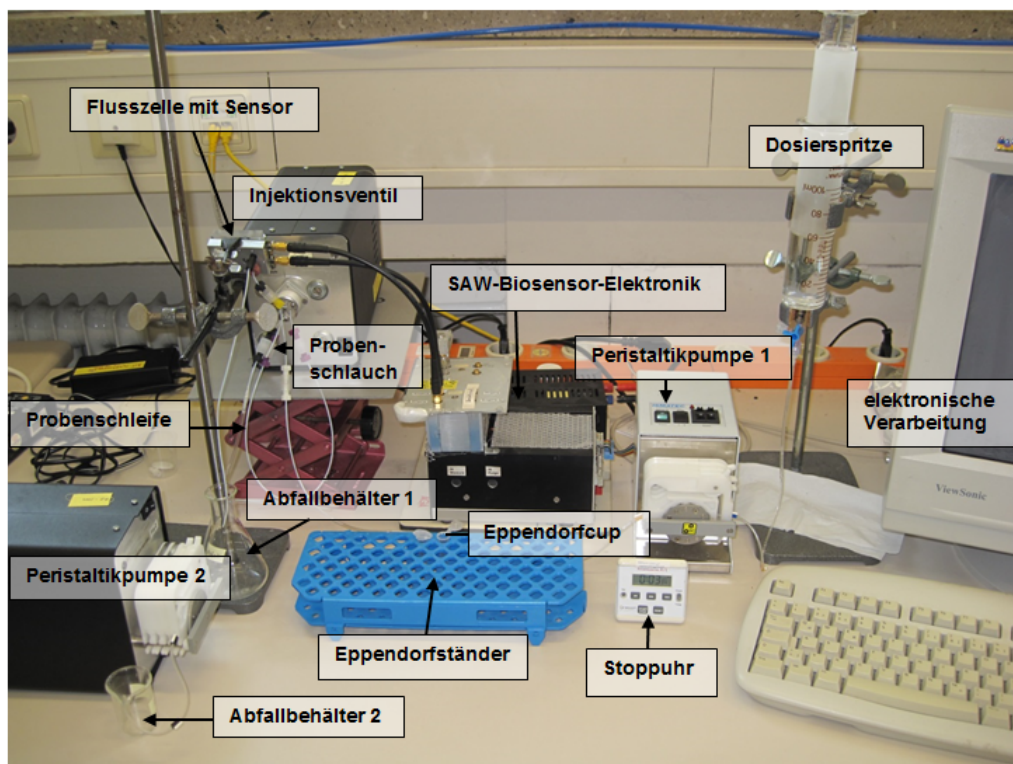


Abbildung 3.1: Versuchsaufbau des Messplatzes

Zum Aufbau des Messplatzes gehören folgende Komponenten:

- Abfallbehälter 1 (1x 50 ml Erlenmeyerkolben für Abfalllösungen)
- Abfallbehälter 2 (1x 25 ml Becherglas für Abfalllösungen)
- Computer mit Messprogramm (KANGAROO 3.3)
- 100 ml Dosierspritze für Puffer (Trägermedium)
- Eppendorfcups für Proben mit Eppendorfständer
- Flusszelle Nr. 6 ( $T \times B \times L = 0,596 \text{ mm} \times 0,608 \text{ mm} \times 4,0 \text{ mm}$ )
- Injektionsventil (6/2-Wege-Ventil)
- Peristaltikpumpe 1 (zum Fördern des Trägermediums)
- Peristaltikpumpe 2 (zum Einziehen von Proben in die Probenschleife)
- Probenschleife (Teflonschlauch,  $V = 200 \text{ }\mu\text{l}$ )
- SAW-Biosensor-Elektronik (o. K, Arbeitsspannung: 2,126 V)
- Stoppuhr

### 3.3.2 Das FIA-System

Der SAW-Biosensor ist im Rahmen dieser Arbeit in ein Fließ-Injektions-Analyse-System (FIA-System) integriert (Abb. 3.2). Dabei fließt ein kontinuierlicher Trägerstrom mit einer Fließgeschwindigkeit von  $51 \text{ }\mu\text{l/min}$  über den Sensor.

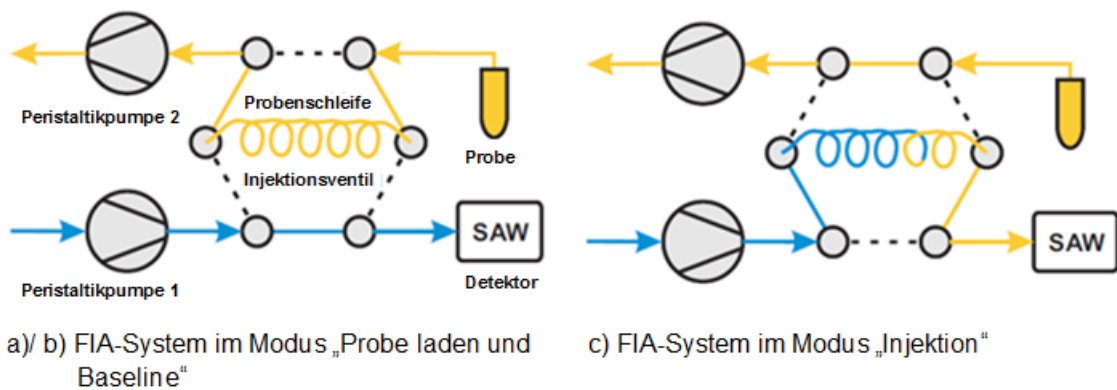


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau eines FIA-Systems, bestehend aus: Peristaltikpumpe 1 und 2, Injektionsventil mit Probenschleife, Probe und Detektor; nach [Rapp, 2009].

#### a) Baseline (Abb. 3.2 a) – blau)

Von der Dosierspritze aus startend fließt der Trägerstrom durch die Peristaltikpumpe 1 angetrieben zum Injektionsventil. Von dort aus gelangt der Trägerstrom direkt über den Sensor in der Flusszelle und wird anschließend in Abfallbehälter 1 gesammelt. Bei diesem Fließweg wird die Baseline für ca. 30 min aufgenommen, bis sich ein stabiles Signal einstellt.



### b) Probe laden (Abb. 3.2 b) – gelb)

Damit eine Probe mit dem Sensor analysiert werden kann, muss diese zuerst in die Probenschleife eingezogen werden. Dazu wird die Probe in einem Eppendorfcup vorgelegt, an den Probenschlauch gehalten und dann die Peristaltikpumpe 2 eingeschaltet. Auf diese Weise wird die Probe durch das Injektionsventil in die Probenschleife gezogen. Ist die Probenschleife vollständig gefüllt, läuft der Strom zurück ins Injektionsventil und wird durch die Peristaltikpumpe 2 gesogen und gelangt anschließend in den Abfallbehälter 2. Danach wird die Peristaltikpumpe 2 wieder ausgeschaltet.

### c) Injektion (Abb. 3.2 c)

Um die Probe zum Sensor zu leiten, wird das Injektionsventil umgeschaltet. Dadurch wird der Trägerstrom (blau) über das Ventil durch die Probenschleife geführt und „schiebt“ die Probe (gelb) aus der Probenschleife über den SAW-Sensor. Das dort erfasste Signal wird detektiert.

## 3.3.3 Der SAW-Sensor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der SAW-Sensor Typ SR062 von der Firma SAW Components Dresden verwendet (Abb. 3.3).

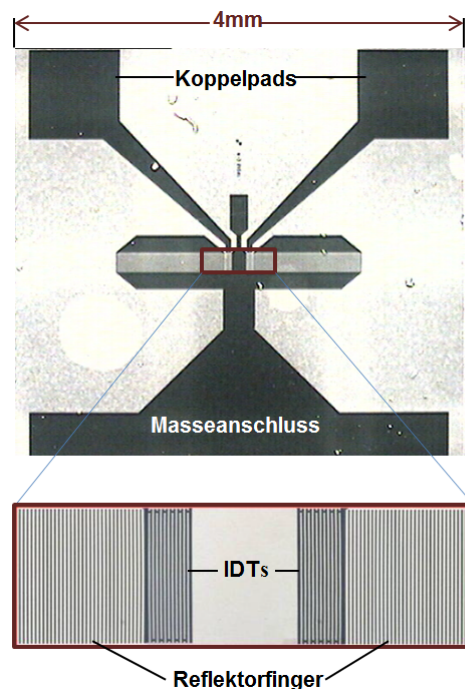


Abbildung 3.3: SAW-Sensor Typ SR062 mit dem Bereich der IDTs in 200facher Vergrößerung (Vergrößerung von [Ngongang, 2012]).



Das Bauteil besteht aus goldenen akustischen Transducern auf 36°YX LiTaO<sub>3</sub> als piezoelektrischem Substrat und arbeitet bei einer Betriebsfrequenz von ca. 428,5 MHz (in PBS). Die Fläche des SAW Sensors beträgt 4 mm x 4 mm, und die Dicke beträgt 0,5 mm. Der sensitive Bereich befindet sich mittig auf dem SAW-Sensor zwischen den IDTs. Über die elektrischen Kontaktflächen, den sogenannten Koppelpads, die sich in den oberen Ecken des Sensors befinden, und über den Masseanschluss, der sich am unteren Rand des Sensors befindet, wird der Sensor kapazitiv angeschlossen.

### 3.3.4 Die Flusszelle

Um die SAW-Sensoren in einen Flüssigkeitsstrom einzubringen und Anlagerungen von Proteinen auf der Sensoroberfläche messen zu können, ist ein Gehäuse notwendig. Dazu wird im Rahmen dieser Arbeit eine Flusszelle (Abb. 3.4) verwendet, welche aus einer auf einem Aluminiumkörper montierten Elektronikplatine besteht, integriert in einen Oszillatorschaltkreis [Länge et al., 2006]. Die Platine ist mit der Antriebselektronik über zwei SMA-Anschlüsse für das Eingangs- und Ausgangssignal verbunden. Leiterbahnen und Kontaktflächen sind aus Gold gefertigt. Der Sensor wird nach unten auf die Kontaktflächen der Platine gelegt, sodass eine kapazitive Kopplung erfolgt. In die Platine ist ein Probenkanal (Maße s. Abschnitt 3.3.1,  $V = 1,45 \mu\text{l}$ ) geätzt, der es der zu untersuchenden Probe erlaubt, entlang des sensitiven Bereichs des SAW-Sensors zu fließen. Anschließend wird die Flusszelle mit dem Deckel verschlossen und dieser mit einer Flügelschraube fixiert.

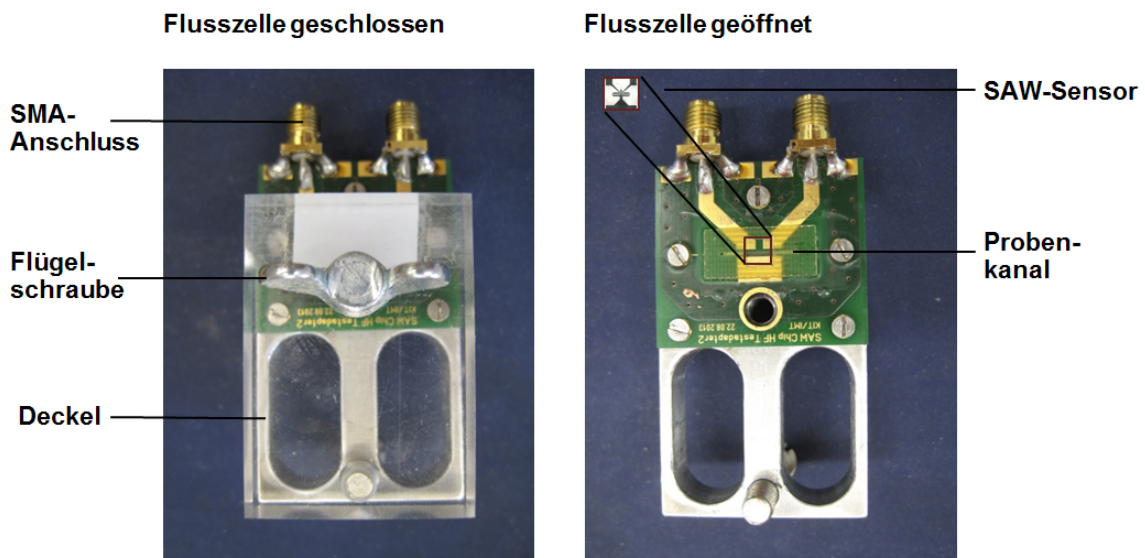


Abbildung 3.4: Sensorgehäuse in Form einer Flusszelle, Ansicht der geschlossenen (links) und geöffneten (rechts) Flusszelle.

## 3.4 Beschichtung der SAW-Sensoren

### 3.4.1 Beschichtung mit SB-PEG

Zur Beschichtung wurden Sensoren die mit Parylen C beschichtet ( $C_d \approx 60$  nm) sind verwendet. Die Oberflächen der Sensoren wurden im Plasmareiniger bei 0,13 mbar für 15 s mit der Einstellung Medium aktiviert. Unmittelbar danach wurde auf die Sensoren je 10  $\mu$ l SB-PEG ( $M_r$  3000) gelöst in bidestilliertem Wasser ( $c(\text{SB-PEG}) = 3$  mg/ml) gegeben und die Sensoren für 24 h in einem Wägeglas stehen gelassen. Anschließend wurden die Sensoren je 2x kurz mit bidestilliertem Wasser gespült und 1 h in einem Wägeglas mit halb geöffnetem Deckel getrocknet. Die Sensoren wurden dann in eine Gel-Pak-Box gelegt und anschließend im Kühlschrank verwahrt. Die Sensoren wurden innerhalb von max. 5 Tagen verwendet.

### 3.4.2 Immobilisierung von Streptavidin als Linker

Das Streptavidin wurde „on-line“, das heißt mit Hilfe des FIA-Systems immobilisiert und das Sensorsignal dabei aufgezeichnet. Weitere Details s. Abschnitt 3.5.2.

### 3.4.3 Immobilisierung von b-anti-CRP als Fängermolekül

Das b-anti-CRP wurde „on-line“, das heißt mit Hilfe des FIA-Systems immobilisiert und das Sensorsignal dabei aufgezeichnet. Weitere Details s. Abschnitt 3.5.3.

## 3.5 Messungen mit dem SAW-Biosensor

### 3.5.1 Nullprobe

In die Flusszelle wird pro Messung jeweils ein neuer Sensor eingelegt, der mit dem Hydrogel SB-PEG beschichtet ist. Nach der Baseline wird eine Nullprobe gemessen. Dazu werden 300 µl PBS in die Probenschleife geladen und injiziert. Der zeitliche Ablauf dieser Messung wird in Tabelle 3.2 veranschaulicht.

Zeit [min]	Modus	Analyt
vor 0 1-5	Laden Injektion	Probe 1 (hier: PBS)
9	Ende der Messung	

Tabelle 3.2: Zeitlicher Ablauf: Nullprobe

### 3.5.2 Immobilisierung von Streptavidin als Linker

Nach der Nullprobe wird eine Probe mit Streptavidin (Konzentration und Volumen der Probe s. Abschnitt 3.2) in die Probenschleife geladen und injiziert. Das Streptavidin bindet nun an die Biotin-Gruppen des Hydrogels und wird somit immobilisiert. Nach Beendigung der Messung wird der Sensor sowie die Probenschleife durch Schalten des Ventils für mindestens 4 min mit dem Trägermedium (PBS) gespült. Der zeitliche Ablauf dieser Messung wird in Tabelle 3.3 veranschaulicht.

Zeit [min]	Modus	Analyt
vor 0 1-5	Laden Injektion	Probe 1 (hier: Streptavidin, 0,1 / 0,05 mg/ml)
9	Ende der Messung	

Tabelle 3.3: Zeitlicher Ablauf: Immobilisierung von Streptavidin als Linker

### 3.5.3 Immobilisierung von b-anti-CRP

In diesem Schritt wird die Immobilisierung von b-anti-CRP auf Streptavidin durchgeführt. Hierbei wird nach einer Nullprobe eine b-anti-CRP Probe (Konzentration und Volumen der Probe s. Abschnitt 3.2) über den Sensor geleitet. Nach Beendigung der Messung wird der Sensor sowie die Probenschleife durch Schalten des Ventils für mindestens 4

min mit dem Trägermedium (PBS) gespült. Der zeitliche Ablauf der gesamten Messung wird in Tabelle 3.4 veranschaulicht.

Zeit [min]	Modus	Analyt
vor 0 1-5	Laden Injektion	Probe 1 (hier: b-anti-CRP, 0 µg/ml)
9-10 13-17	Laden Injektion	Probe 2 (hier: b-anti-CRP, 10 / 100 µg/ml)
21	Ende der Messung	

Tabelle 3.4: Zeitlicher Ablauf: Immobilisierung von b-anti-CRP

### 3.5.4 Unspezifische Bindung von HSA

Hier wird die Abschirmung der Sensoroberfläche gegen unspezifische Bindung von HSA auf der Sensoroberfläche untersucht. Die Sensorfläche wird nach einer Nullprobe zweimal mit HSA (Konzentration und Volumen der Proben s. Abschnitt 3.2) beprobt. Nach Beendigung der Messung wird der Sensor sowie die Probenschleife durch Schalten des Ventils für mindestens 4 min mit dem Trägermedium (PBS) gespült. Der zeitliche Ablauf der gesamten Messung wird in Tabelle 3.5 veranschaulicht.

Zeit [min]	Modus	Analyt
vor 0 1-5	Laden Injektion	Probe 1 (hier: HSA, 0 mg/ml)
9-10 13-17	Laden Injektion	Probe 2 (hier: HSA, 1 mg/ml)
21-22 25-29	Laden Injektion	Probe 3 (hier: HSA, 1 mg/ml)
33	Ende der Messung	

Tabelle 3.5: Zeitlicher Ablauf: Unspezifische Bindung von HSA

### 3.5.5 Assay mit CRP auf immobilisiertem b-anti-CRP

In diesem Schritt wird die Bindung des Proteins CRP an das immobilisierte b-anti-CRP gemessen. Hierbei werden nach einer Nullprobe CRP-Proben (Konzentrationen und Volumen der Proben s. Abschnitt 3.2) in aufsteigender Konzentration über den Sensor geleitet. Der zeitliche Ablauf der gesamten Messung wird in Tabelle 3.6 veranschaulicht.

Zeit [min]	Modus	Analyt
vor 0 1-5	Laden Injektion	Probe 1 (hier: CRP, 0 µg/ml)
9-10 13-17	Laden Injektion	Probe 2 (hier: CRP, 1 µg/ml)
21-22 25-29	Laden Injektion	Probe 3 (hier: CRP, 10 µg/ml)
33-34 37-41	Laden Injektion	Probe 4 (hier: CRP, 100 µg/ml)
45	Ende der Messung	

Tabelle 3.6: Zeitlicher Ablauf: Assay mit CRP auf immobilisiertem b-anti-CRP

### 3.6 Datenauswertung

Die Datenauswertung wird hier beispielhaft an einem Assay mit biotinyliertem BSA (b-BSA) auf immobilisiertem Streptavidin vorgestellt, durchgeführt nach dem zeitlichen Ablauf aus Tabelle 3.7.

Zeit [min]	Modus	Analyt
vor 0 1-5	Laden Injektion	Probe 1 (hier: b-BSA, 0 µg/ml)
9-10 13-17	Laden Injektion	Probe 2 (hier: b-BSA, 1 µg/ml)
21-22 25-29	Laden Injektion	Probe 3 (hier: b-BSA, 10 µg/ml)
33-34 37-41	Laden Injektion	Probe 4 (hier: b-BSA, 100 µg/ml)
45	Ende der Messung	

Tabelle 3.7: Zeitlicher Ablauf: b-BSA Assays

Hier erfolgt die Masseanlagerung über eine spezifische Bindung der b-BSA-Probe an die Streptavidin-Oberfläche des SAW-Sensors. Bei der kompletten Messung wird die Differenzfrequenz detektiert. Das heißt, lagert sich Masse an sinkt die Bauteil-Frequenz, während die Frequenz eines parallel geschalteten Referenzoszillators konstant bleibt zur Referenzfrequenz (434 MHz). Somit steigt die Differenzfrequenz die als Signal ausgegeben wird (in den Diagrammen als „Frequenz“ bezeichnet). Abbildung 3.5 zeigt die Detektion nach Eingeben der Messdaten in Excel als Plot. Die Zeitintervalle, in dem die Proben über den Sensor laufen, sind durch senkrechte Linien gekennzeichnet.

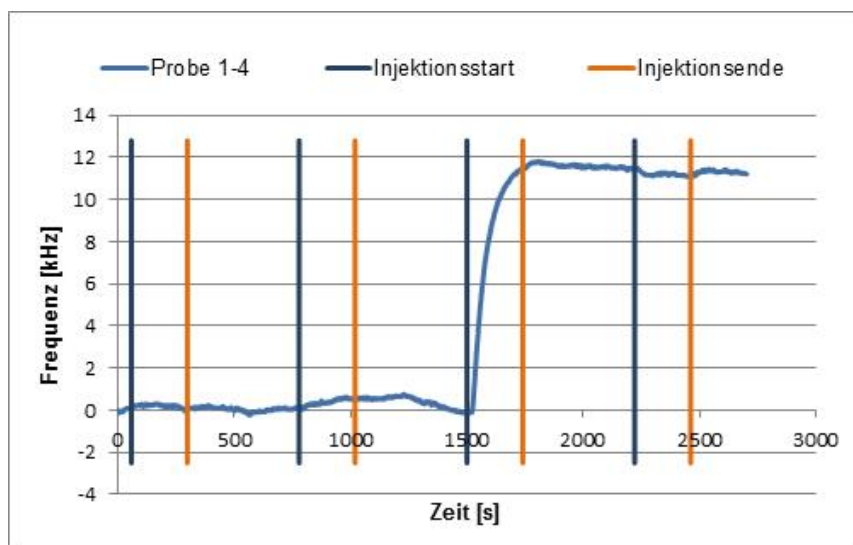


Abbildung 3.5: Kurvenverlauf der gesamten Messung

Da der genaue Anstieg einer einzelnen Probe in dieser Ansicht schlecht zu erkennen ist, wird nach der Messung eine Verarbeitung der Messwerte mithilfe von Rechenoperationen in Excel (Microsoft) durchgeführt. Zuerst wird eine Zeitkorrektur (Abb. 3.6) vorgenommen. Das heißt, der Zeitpunkt jeder Probeninjektion wird auf  $t = 60$  s gelegt.

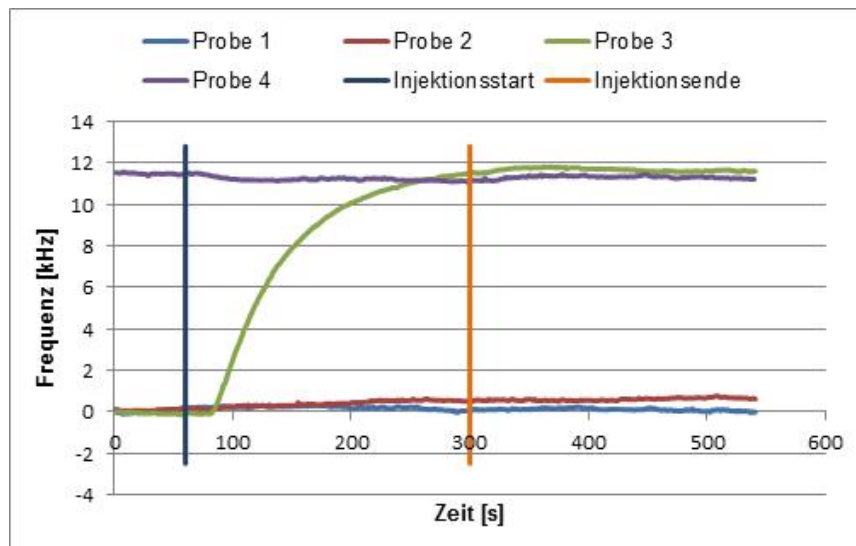


Abbildung 3.6: Messung aus Abbildung 3.5 nach Zeitkorrektur

Als nächstes wird eine Offset-Korrektur (Abb. 3.7) durchgeführt. Eine Offset-Korrektur ist die Anpassung der Messwerte an die Frequenz-Achse, dass heißt alle Proben starten bei 0 Hz. Ausgang dafür sind die zeitkorrigierten Messwerte, von denen jeweils die gemessene Differenzfrequenz bei  $t = 0$  subtrahiert wird. Dabei ist zu beachten, dass immer  $t = 0$  des jeweiligen Einzelintervalls verwendet werden muss.

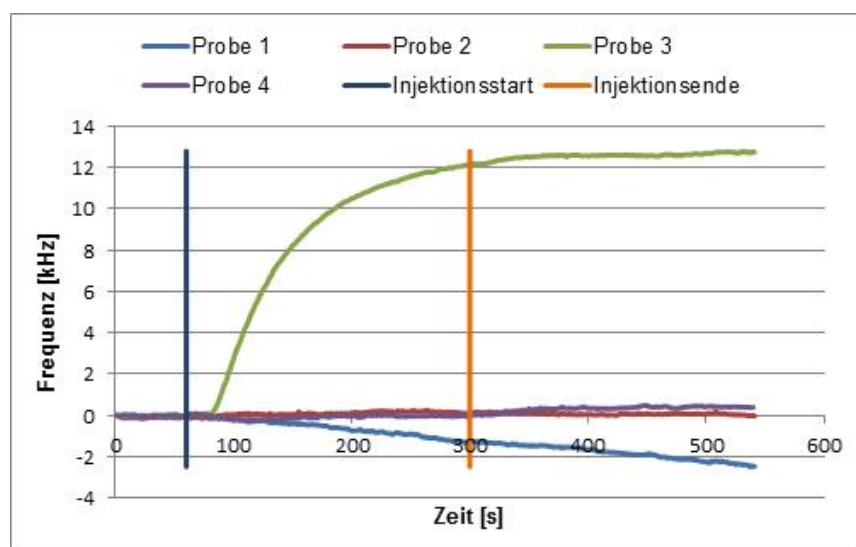


Abbildung 3.7: Messung nach Zeit- und Offset-Korrektur

Anschließend wird eine lineare Driftkorrektur (Abb. 3.8) der Einzelintervalle durchgeführt. Dabei wird über eine lineare Regression im Intervall von 0-60 s die Steigung berechnet. Diese Steigung ist dann die lineare Drift der Kuve in diesem Einzelintervall. Letzter Schritt ist die Berechnung der driftkorrigierten Messwerte über folgende Gleichung:

$$f(\text{driftkorrigiert}) = f(\text{offsetkorrigiert}) - m_f(\text{Steigung}) \cdot t(\text{zeitkorrigiert})$$

Dadurch erhält man die driftkorrigierten Kurven. Diese Kurven können anschließend ausgewertet werden.

In dieser exemplarischen Messung (Abb. 3.8) würde vor allem Probe 3 (s. Tab. 3.7) ausgewertet werden, da insbesondere hier ein Anstieg der Kurve zu sehen ist, die in einem Plateau endet. Der Auswertungsbereich liegt zwischen 360 s bis 420 s (Abb. 3.8 - grau), da sich hier ein konstantes Signal eingestellt hat.

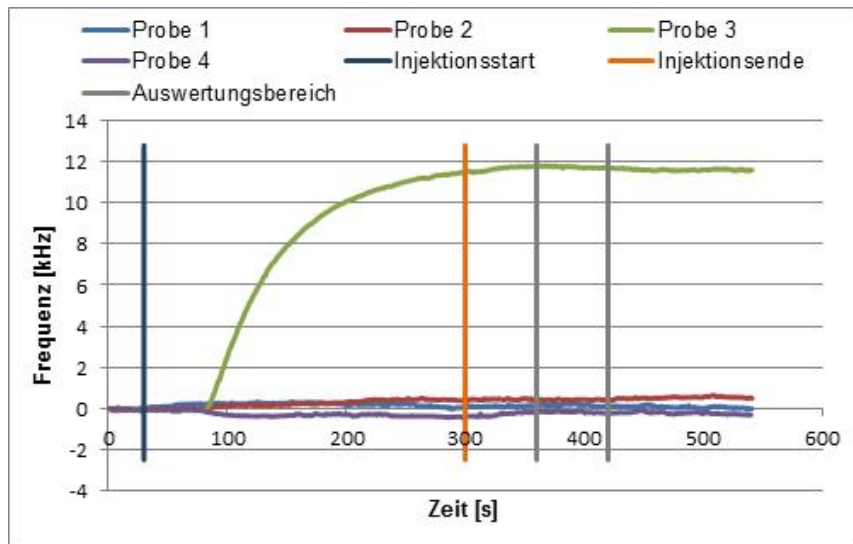


Abbildung 3.8: Messung aus Abbildung 3.7 nach Driftkorrektur



## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Vorversuch zum neuen Hydrogel SB-PEG

Im Praktikum „Eignung von Polymeren zur Herstellung von Biosensorchips“ [Wagner, 2014] konnte bereits gezeigt werden, dass das neue Hydrogel SB-PEG das bisher verwendete Hydrogel AB-PEG als Sensorbeschichtung ablösen kann, da es sich, beim Nachweis von b-BSA bewährt hat.

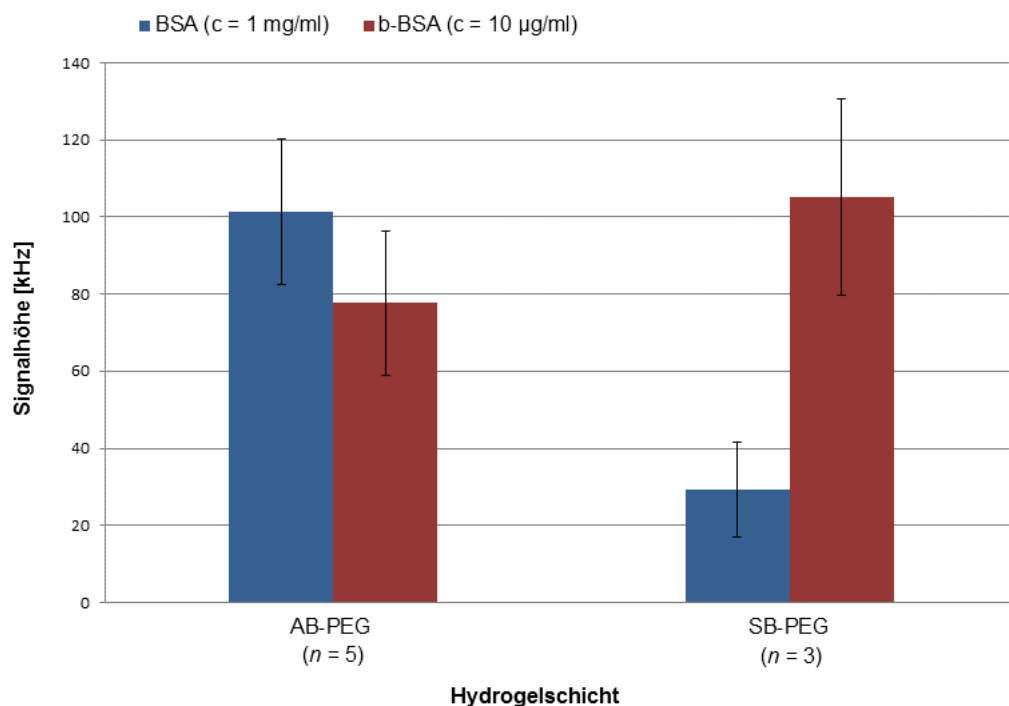


Abbildung 4.1: Vergleich der Signalhöhe von BSA mit b-BSA auf Streptavidin-funktionalisierter SAW-Biosensoroberfläche mit AB-PEG oder SB-PEG als Hydrogel-Zwischenschicht

Im Balkendiagramm in Abbildung 4.1 werden die Ergebnisse von BSA und b-BSA auf AB-PEG und SB-PEG als Hydrogel-Zwischenschicht aus dem Praktikum nocheinmal einander gegenüber gestellt.

Aus dem Balkendiagramm geht hervor, dass beide, sowohl SB-PEG als auch AB-PEG, ein gutes spezifisches b-BSA Signal zeigen. Das AB-PEG zeigt beim b-BSA eine Signalthöhe von 7,8 kHz mit einer Standardabweichung von  $\pm 1,9$  kHz. Das SB-PEG zeigt beim b-BSA eine Signalthöhe von 10,5 kHz mit einer Standardabweichung von  $\pm 2,5$  kHz. Das SB-PEG zeigt zwar eine größere Signalthöhe als das AB-PEG, da sich aber aufgrund der Standardabweichungen die Fehlerbereiche von SB-PEG und AB-PEG überschneiden,

kann man nicht sagen, dass SB-PEG besser funktioniert hat. Bei der Abschirmung der Schicht gegen BSA ist zu erkennen, dass mit AB-PEG als Zwischenschicht das BSA eine Signalhöhe von 10,1 kHz mit einer Standardabweichung von  $\pm 1,9$  kHz zeigt. Dies ist im Vergleich zur Signalhöhe beim b-BSA (7,8 kHz) sehr hoch, daher kann man sagen, dass das AB-PEG schlecht gegen BSA abschirmt. Das SB-PEG zeigt beim BSA eine Signalhöhe von nur 2,9 kHz mit einer Standardabweichung von  $\pm 1,2$  kHz. Dies ist im Vergleich zur Signalhöhe vom b-BSA (10,5 kHz) relativ niedrig, daher schirmt SB-PEG relativ gut vor BSA ab.

Man kann also sagen, dass das SB-PEG dem AB-PEG als Zwischenschicht vorzuziehen ist, da die Abschirmung relativ gut funktioniert hat und anschließend ein hohes b-BSA Signal zeigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung mit SB-PEG ein schonenderes Verfahren gegenüber nutzbaren Kunststoffen für einen Biosensorchip darstellt. Weiter bietet das SB-PEG den Vorteil, dass das bisherige Beschichtungsprotokoll um einen Schritt gekürzt werden kann (s. Abschnitt 2.3.3) und daher die Sensoren schneller verwendbar sind. Aufgrund dieser Vorzüge soll mit dieser Beschichtung ein CRP-Assay erstellt werden, dass CRP im physiologisch relevanten Bereich ( $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ) nachweisen kann.

Die Ergebnisse aus Abbildung 4.1 geben uns Hinweise für die folgende Erstellung eines CRP-Assays. Da das CRP vorerst mit HSA als Hintergrund nachgewiesen werden soll (s. Abschnitt 4.2), aber keine unspezifische Anbindung von HSA zeigen darf, liegt aufgrund der Ergebnisse aus dem Praktikum die Vermutung nahe, dass die Abschirmung gegen HSA bei dieser Art der Oberflächenmodifikation ähnlich wie bei BSA aussehen könnte, da sowohl HSA als auch BSA zur Familie der Serum Albumine gehören. Dies muss jedoch noch überprüft werden. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit die Abschirmung der sensitiven Schicht gegen HSA Adsorption nach jedem Modifikationsschritt überprüft. Während des Praktikums wurden b-BSA-Proben mit den Konzentrationen 0/1/10/100  $\mu\text{g/ml}$  untersucht. Die nachweisbare Konzentration von b-BSA lag dann bei 10  $\mu\text{g/ml}$ . Daher sollte es möglich sein, dass CRP in diesem für die Diagnostik physiologisch relevanten Bereich ebenfalls nachgewiesen werden kann.

## 4.2 Abschirmung der Sensorbeschichtungen aus den Zwischenschritten bei der Oberflächenfunktionalisierung gegen unspezifische Adsorption von HSA

Ziel dieser Arbeit ist es, das C-reaktive Protein mit HSA im Probenhintergrund nachzuweisen. Ein wichtiger Punkt beim Nachweis von CRP mit HSA im Probenhintergrund ist es, eine ausreichende Abschirmung der Beschichtung gegen Adsorption von Fremdproteinen zu erreichen. Im folgenden Abschnitt wird das Sensorsignal bei der Adsorption von HSA nach den einzelnen Schritten der Oberflächenfunktionalisierung der SAW-Biosensoren überprüft.

Dazu wurden jeweils drei Messungen pro Modifikationsschritt durchgeführt. Für jede Messung wurde ein neuer Sensor verwendet. Die Beprobung bestand immer aus Nullprobe, HSA-Probe 1 und HSA-Probe 2 (s. Abschnitt 3.5, Tab. 3.5.4).

### 4.2.1 Referenzmessung: HSA auf Parylen C

Zuerst wurden Messungen mit HSA auf der Parylen C-Schicht als Referenz getestet, um anschließend eine Aussage treffen zu können, wie viel eine Oberflächenmodifikation hinsichtlich der Abschirmung gegen Fremdproteine bringt.

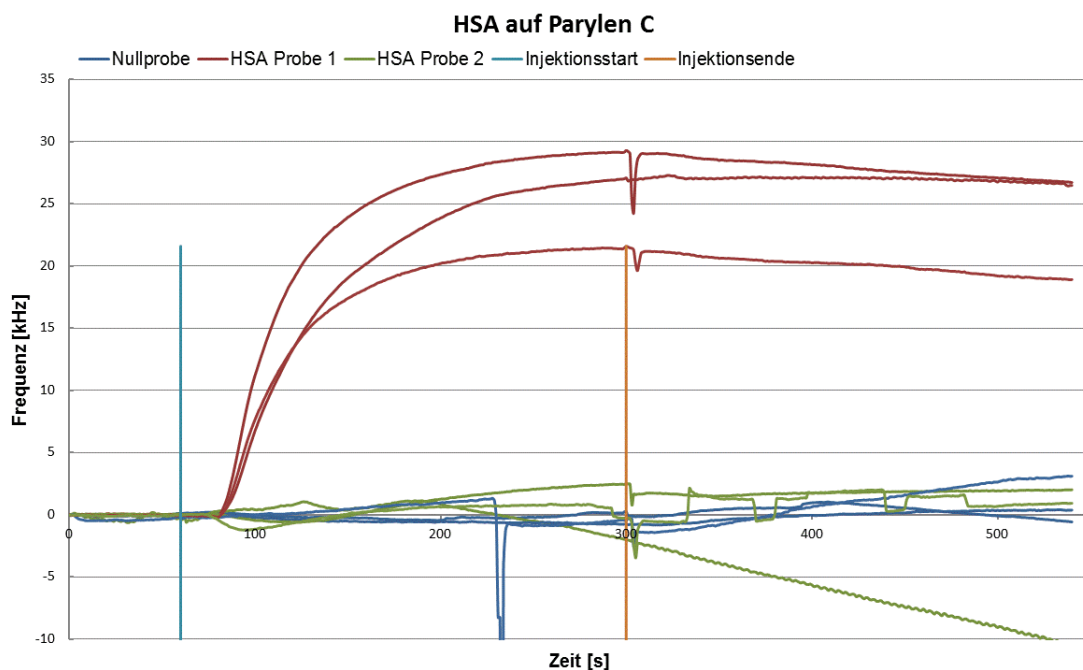


Abbildung 4.2: HSA-Adsorption auf Parylen C

In Abbildung 4.2 ist zu erkennen, dass das Parylen C das HSA nicht abschirmt. Dies war zu erwarten, da Parylen C aufgrund einer hydrophoben Oberfläche, die gerne Proteine bindet, keine abschirmende Eigenschaft besitzt. Die Nullproben zeigen keine positiven Signale. Die ersten HSA-Proben zeigen im Auswertungsbereich von 360-420 s Signalhöhen von ca. 20-27 kHz. Die zweiten HSA-Proben zeigen keine positiven Signale mehr, dass heißt die jeweils ersten HSA-Proben haben die Oberfläche des Parylen C vollständig besetzt.

#### 4.2.2 HSA auf Parylen C + SB-PEG

Anschließend wurde die Abschirmung gegen HSA auf dem Hydrogel SB-PEG überprüft.

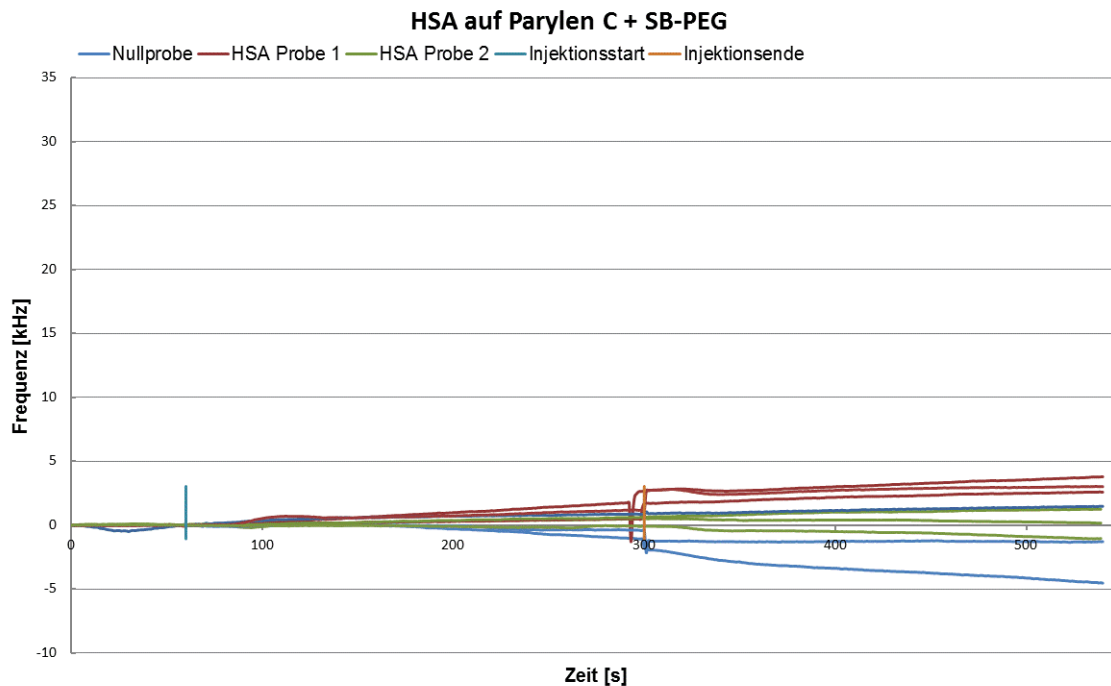


Abbildung 4.3: HSA-Adsorption auf Parylen C + SB-PEG

In Abbildung 4.3 ist zu erkennen, dass die Nullproben keinen positiven Ausschlag zeigen. Zudem ist deutlich zu erkennen, dass die Abschirmung der SB-PEG-Schicht gegen HSA relativ gut ist, da hier die Signalhöhen der ersten HSA-Proben im Auswertungsbereich von 360-420 s bei ca. 2,5 kHz liegen. Die zweiten HSA-Proben zeigen keine positiven Signale mehr, somit gibt es keine weitere unspezifische Bindung von HSA an die Oberfläche.

### 4.2.3 HSA auf Parylen C + SB-PEG + Streptavidin

Der nächste Schritt war es, die Abschirmung gegen HSA nach der Immobilisierung von Streptavidin ( $c = 0,1 \text{ mg/ml}$ ) auf der SB-PEG-Schicht zu testen.

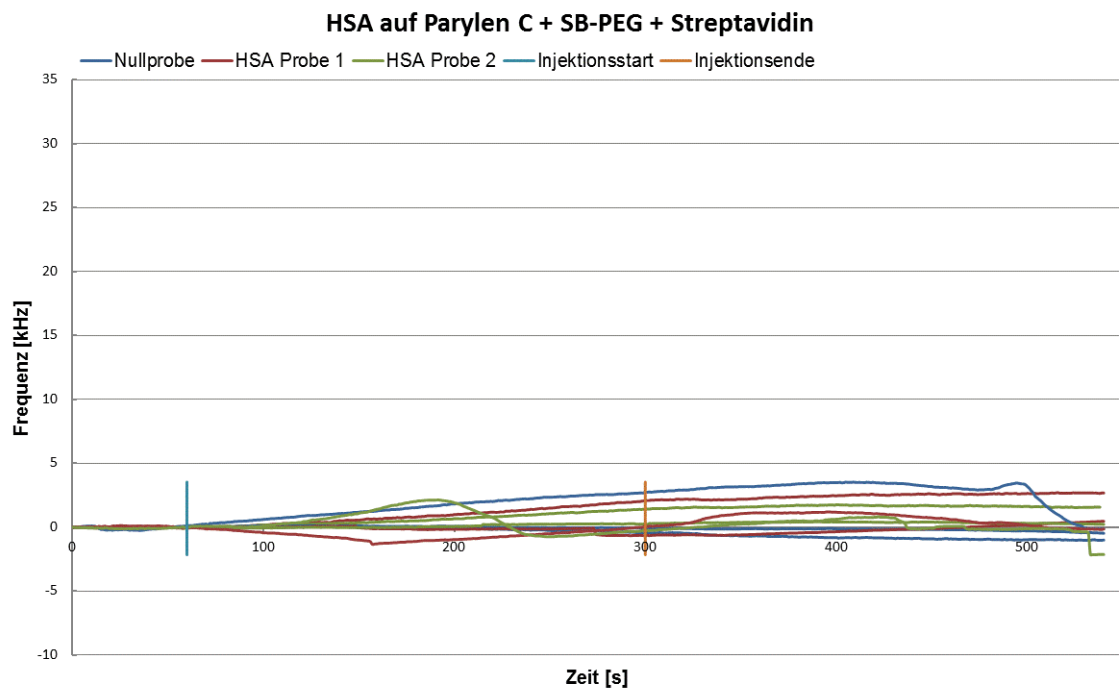


Abbildung 4.4: HSA-Adsorption auf Parylen C + SB-PEG + Streptavidin

In Abbildung 4.4 ist zu erkennen, dass die Nullproben keinen positiven Ausschlag zeigen. Zudem ist zu erkennen, dass die Abschirmung der Schicht gegen HSA relativ gut ist, da hier die Signalhöhen der ersten HSA-Proben im Auswertungsbereich von 360-420 s bei ca. 1-2 kHz liegen. Auch die zweiten HSA-Proben zeigen keine positiven Signale, somit gibt es keine weitere unspezifische Bindung von HSA an die Oberfläche.

### 4.2.4 HSA auf Parylen C + SB-PEG + Streptavidin + b-anti-CRP

Letzter Schritt war es nun die Abschirmung gegen HSA nach Immobilisierung von b-anti-CRP ( $c = 10 \text{ µg/ml}$ ) auf der Streptavidin-Schicht zu untersuchen.

In Abbildung 4.5 ist zu erkennen, dass die Nullproben keinen positiven Ausschlag zeigen. Zudem ist zu erkennen, dass die Abschirmung nach diesem Modifikationsschritt gegen HSA sehr gut funktioniert hat. Die Messungen unterlagen lediglich einer leichten Driftänderung, daher haben die Signale meist negative Werte angenommen. Die Signalhöhen der ersten HSA-Proben betragen ca. 0-6 kHz. Die zweite HSA-Proben zei-

gen keine positiven Signale, somit gibt es auch nachfolgend keine weitere unspezifische Bindung von HSA an die Oberfläche.

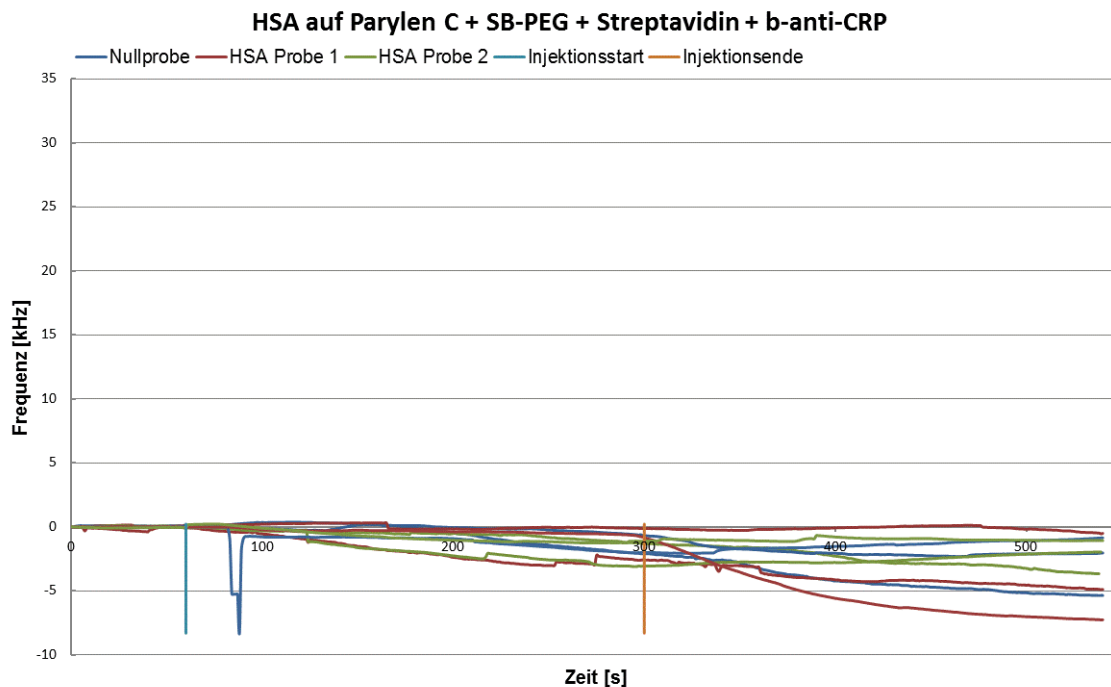


Abbildung 4.5: HSA-Adsorption auf Parylen C + SB-PEG + Streptavidin + b-anti-CRP

Im folgenden wird die Abschirmung der Sensorbeschichtungen aus den Zwischenschritten bei der Oberflächenfunktionalisierung gegen unspezifische Adsorption von HSA miteinander verglichen.

#### 4.2.5 Vergleich der Sensorbeschichtungen aus den Zwischenschritten bei der Oberflächenfunktionalisierung gegen unspezifische Adsorption von HSA

Um die einzelnen Messungen der vorherigen Abschnitte besser miteinander vergleichen zu können, wurde pro Zwischenschritt der Oberflächenfunktionalisierung aus dem Mittelwert von jeweils drei Messungen ein Balkendiagramm erstellt. Dabei wurde immer nur HSA-Probe 1 im Bereich 360-420 s ausgewertet, da zuvor gezeigt werden konnte, dass wenn überhaupt ausschließlich Probe 1 einen Signalanstieg gezeigt hat.

In Abbildung 4.6 ist deutlich zu erkennen, dass alle Modifikationsschritte besser gegen HSA abgeschirmt haben als die Referenzmessung, die einen Wert von  $25,2 \text{ kHz} \pm 4,3 \text{ kHz}$  bei der HSA-Adsorption zeigt.

Die Abschirmung von SB-PEG gegen HSA hat gut funktioniert. HSA auf SB-PEG hat einen Wert von  $2,6 \text{ kHz} \pm 0,4 \text{ kHz}$  und ist daher signifikant niedriger als der Wert der Referenzmessung ( $25,2 \text{ kHz} \pm 4,3$ ).

Die Abschirmung von SB-PEG + Streptavidin hat auch sehr gut funktioniert. Der Wert des SP-PEG + Streptavidin liegt bei  $1,1 \text{ kHz} \pm 1,4 \text{ kHz}$  und ist daher signifikant niedriger als der Wert der Referenzmessung. Im Rahmen der Fehlerbetrachtung sind das SB-PEG + Streptavidin und das SB-PEG jedoch vergleichbar. Man kann also nicht sagen das SB-PEG + Streptavidin besser gegen HSA abschirmt.

Die Abschirmung von SB-PEG + Streptavidin + b-anti-CRP hat hervorragend funktioniert. Der Wert liegt bei  $-3,1 \text{ kHz} \pm 2,6 \text{ kHz}$  und ist somit signifikant niedriger als der Wert der Referenzmessung. Der negative Wert entsteht lediglich durch eine leichte Driftänderung in der Messung. Zudem ist der Wert von SB-PEG + Streptavidin + b-anti-CRP signifikant niedriger als die Werte von SB-PEG und SP-PEG + Streptavidin. Daher kann man sagen, dass diese Schicht gegen HSA abschirmt.

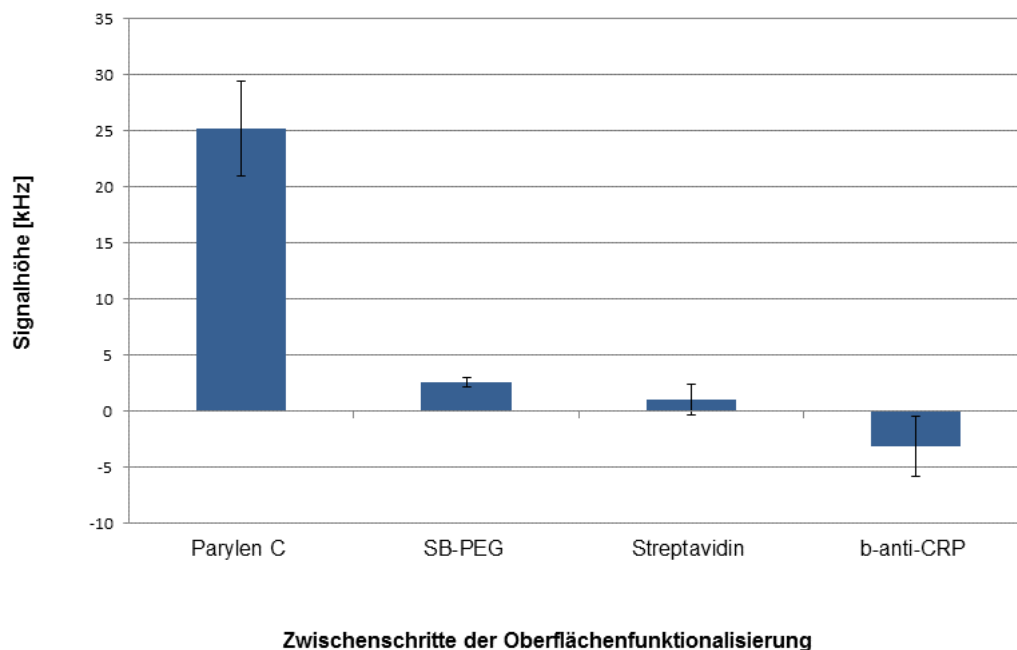


Abbildung 4.6: Abschirmung der Sensorbeschichtungen aus den Zwischenschritten bei der Oberflächenfunktionalisierung gegen unspezifische Adsorption von HSA ( $n = 3$ )

### 4.3 CRP-Assay

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Entzündungsmarker CRP mit HSA im Probenhintergrund nachgewiesen werden. Dabei werden folgende Aspekte untersucht: die Anbindung von Streptavidin an die Hydrogelschicht SB-PEG, die Immobilisierung des biotinylierten Antikörpers auf die Streptavidin-Schicht, die unspezifische Adsorption von HSA bzw. deren Abschirmung und die Anbindung von CRP in HSA-Lösung als Probenhintergrund an die b-anti-CRP-Schicht. Um dies zu testen, wurden vier CRP-Assays durchgeführt, Messprotokoll siehe Abschnitt 3.5. In Tabelle 4.1 wird veranschaulicht, welche Konzentrationen zur Oberflächenmodifikation bei den jeweiligen CRP-Assays verwendet wurden.

Messung	Streptavidin	b-anti-CRP	HSA	CRP
1er CRP-Assay	0,1 mg/ml	0/100 µg/ml	0/1/1 mg/ml	0/1/10/100 µg/ml
2er CRP-Assay	0,1 mg/ml	0/10 µg/ml	0/1/1 mg/ml	0/1/10/100 µg/ml
3er CRP-Assay	0,05 mg/ml	0/10 µg/ml	0/1/1 mg/ml	0/1/10/100 µg/ml
4er CRP-Assay	0,05 mg/ml	0/100 µg/ml	0/1/1 mg/ml	0/1/10/100 µg/ml

Tabelle 4.1: Konzentrationen der verwendeten Immobilisierungsreagenzien und Proben für den jeweiligen CRP-Assay

#### 4.3.1 Streptavidin (Linker) und b-anti-CRP (Fängermolekül)

In diesem Abschnitt wird jeweils der Kurvenverlauf von der Immobilisierung von Streptavidin mit den Konzentrationen 0,05 mg/ml und 0,1 mg/ml auf der Hydrogelschicht SB-PEG und von der Immobilisierung von b-anti-CRP mit den Konzentrationen 10 und 100 µg/ml auf der Streptavidin-Schicht aus den folgenden vier durchgeführten CRP-Assays (Tab. 4.1) gezeigt.

In Abbildung 4.7 ist zu erkennen, dass alle Kurven zunächst steil ansteigen und anschließend in einem Plateau enden. Die Kurven von Streptavidin mit einer Konzentration von 0,05 µg/ml steigen etwas steiler an, als die Kurven von Streptavidin mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Fließgeschwindigkeit hier geringfügig höher war. Zudem ist zu erkennen, dass sowohl bei einer Konzentration von 0,05 mg/ml, als auch bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml etwa gleich viel Streptavidin bindet. Im Auswertungsbereich von 360-420 s liegen die Signalthöhen bei 30-34 kHz.



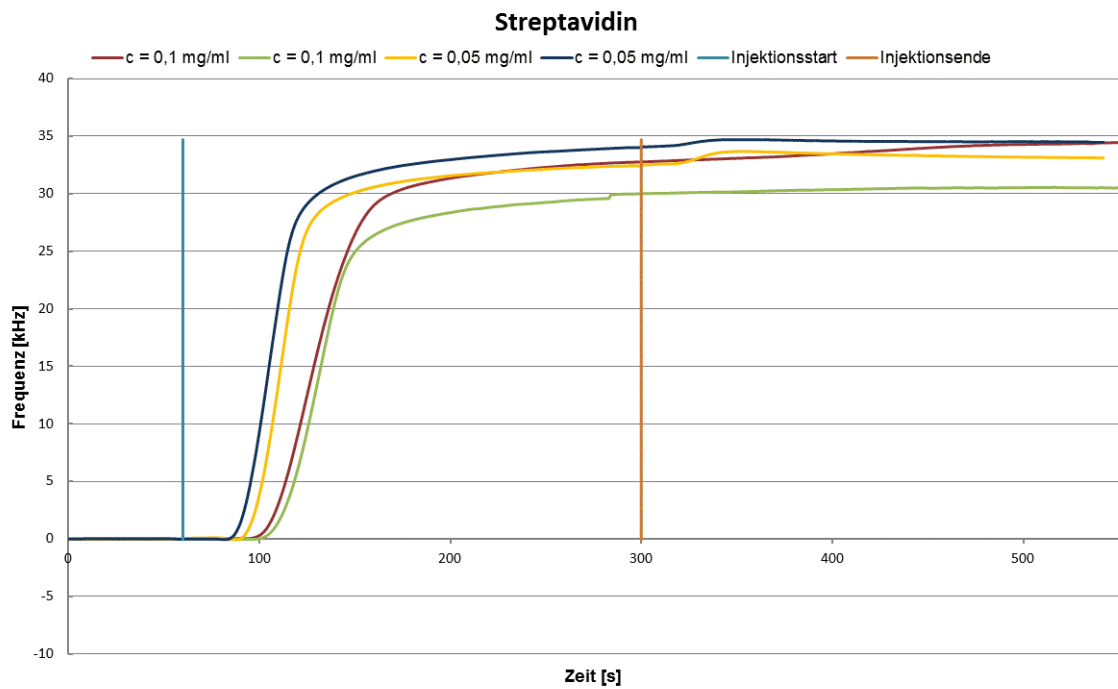


Abbildung 4.7: Immobilisierung von Streptavidin (Linker)

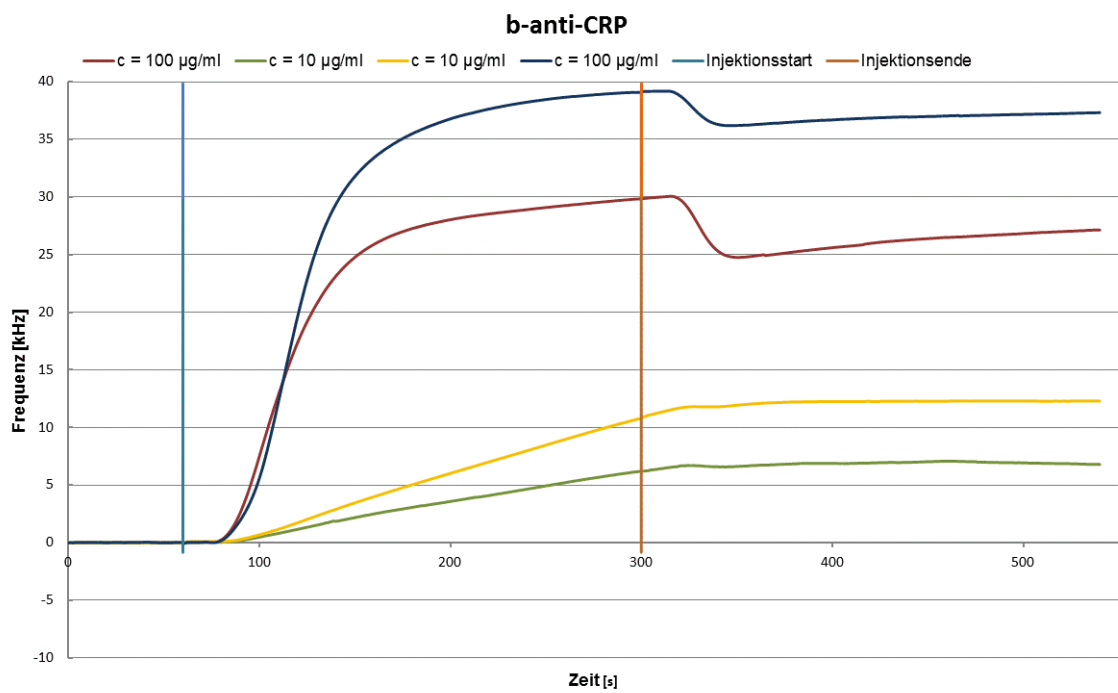


Abbildung 4.8: Immobilisierung von b-anti-CRP (Fängermolekül)

In Abbildung 4.8 ist zu erkennen, dass sowohl bei einer b-anti-CRP-Konzentration von 10 µg/ml, als auch bei einer b-anti-CRP-Konzentration von 100 µg/ml b-anti-CRP auf der Oberfläche bindet. Bei einer Streptavidin-Konzentration von 0,1 mg/ml erhält man, in einem Auswertungsbereich von 360-420 s, bei einer b-anti-CRP-Konzentration von 100 µg/ml ein Signal von 25 kHz und bei einer b-anti-CRP-Konzentration von 10 µg/ml ein Signal von 7 kHz. Bei einer Streptavidin-Konzentration von 0,05 mg/ml erhält man bei einer b-anti-CRP-Konzentration von 100 µg/ml ein Signal von 35 kHz und bei einer b-anti-CRP-Konzentration von 10 µg/ml ein Signal von 12 kHz in einem Auswertungsbereich von 360-420 s. Das heißt, die b-anti-CRP-Signal war immer höher bei einer Streptavidin-Konzentration von 0,05 mg/ml (Zusammenhang: s. Farbgebung in den Diagrammen). Dies würde man eigentlich nicht erwarten, allerdings kann es sein, dass durch eine niedrigere Streptavidin-Konzentration aufgrund der geringeren Dichte auf der Oberfläche mehr zugängliche freie Bindungsstellen für das b-anti-CRP zur Verfügung stehen und daher eine höhere Anbindung erfolgt. Zudem ist zu erkennen, dass bei einer b-anti-CRP-Konzentration von 10 µg/ml die Oberfläche nicht vollständig besetzt ist, aber bei einer b-anti-CRP-Konzentration von 100 µg/ml. Dies ist in Abbildung 4.8 dadurch erkennbar, dass während der Injektion von b-anti-CRP mit einer Konzentration von 100 µg/ml das Signal zunächst höher ist und nach der Injektion leicht absinkt. Das heißt physisorbiertes b-anti-CRP wird herunter gewaschen und affin gebundenes b-anti-CRP bleibt darauf. Bestätigt wurde dies mit einer zweiten b-anti-CRP-Probe mit einer Konzentration von 100 µg/ml (1x durchgeführt, hier nicht gezeigt), es war kein Anstieg mehr zu sehen.

### **Zusammenfassung**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination Streptavidin + b-anti-CRP zur Oberflächenfunktionalisierung von SAW-Biosensoren für den CRP-Nachweis auf SB-PEG funktioniert hat. Zur Leistungsfähigkeit der Schichten in den vier CRP-Assays s. Abschnitt 4.3.2-4.3.5.

### **4.3.2 Erster CRP-Assay**

Beim ersten CRP-Assay wurde eine Streptavidin-Konzentration von 0,1 mg/ml und eine b-anti-CRP-Konzentration von 100 µg/ml für die sensitive Erkennungsschicht verwendet (s. Tab. 4.1).

In Abbildung 4.9 ist zu erkennen, dass sowohl bei der CRP-Probe mit einer Konzentration von 10 µg/ml als auch bei der CRP-Probe mit der Konzentration 100 µg/ml die Kurven steil absinken, in einen leichten Überschwinger übergehen, anschließend reversibel über ihr Ausgangsniveau hinaus zurück laufen und danach in einem Plateau enden. Diese Art von Kurvenverlauf ist auf den Ioneneffekt zurückzuführen. Dieser Effekt kann sich einstellen, da Probenhintergrund und Trägermedium eine unterschiedliche Zusammen-

setzung haben, vor allem bezüglich der Ionenstärke. Somit nimmt der Ioneneffekt hier mit steigender CRP-Konzentration zu, da ein höherer „Fremd-Probenhintergrund“ aus der Stammlösung vorhanden ist. Da die Kurven einen reversiblen Effekt zeigen, ist eine Auswertung erst möglich, wenn wieder PBS über den Sensor geht, da dann der Masseeffekt nicht mehr überlagert wird. Das heißt, es wird die Menge an CRP gemessen, die tatsächlich gebunden hat. Somit kann dort in einem Bereich zwischen 360-420 s ausgewertet werden. Die Nullprobe und die CRP-Probe mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  zeigen eine leicht steigende lineare Kurve, die allerdings eher von einer leichten zusätzlichen Drift herrührt. Auch hier wird in einem Bereich zwischen 360-420 s ausgewertet.

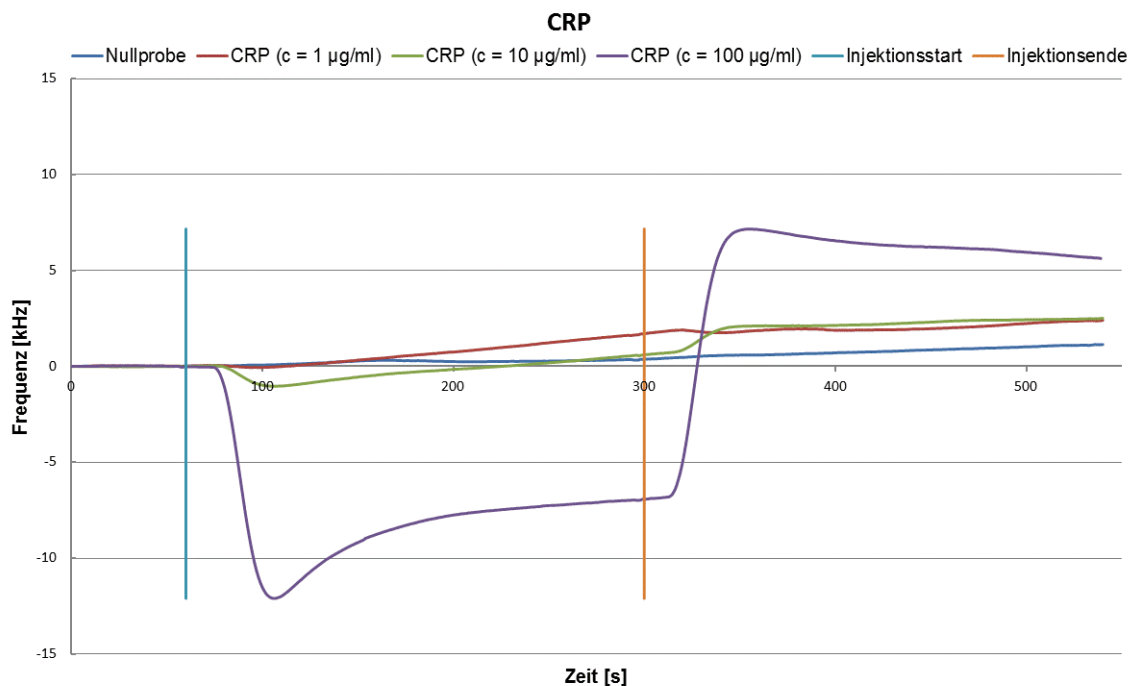


Abbildung 4.9: CRP-Kurvenverläufe aus dem ersten CRP-Assay

In Abbildung 4.10 sind die jeweiligen Signalthöhen des ersten CRP-Assays in einem Balkendiagramm dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass Streptavidin sehr gut bindet, mit einer Signalthöhe von 33,4 kHz. Das b-anti-CRP-Signal beträgt 25,4 kHz. Zudem ist zu erkennen, dass die Abschirmung gegen HSA sehr gut funktioniert hat, da sich kein HSA angelagert hat. Es wurde nur die erste HSA-Probe ausgewertet, da wenn überhaupt ausschließlich Probe 1 einen Signalanstieg gezeigt hat. Der geringfügig negative Wert entsteht lediglich durch eine leichte zusätzliche Drift in der Messung. Das CRP zeigt eine Signalthöhe von 1,9 kHz bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$ , eine Signalthöhe von 2,1 kHz bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  und eine Signalthöhe von 6,7 kHz bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$ . Allerdings rührt das Signal bei der CRP-Probe mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  eher von einer zusätzlichen Drift als davon, dass sich CRP an der Oberfläche angelagert hat.

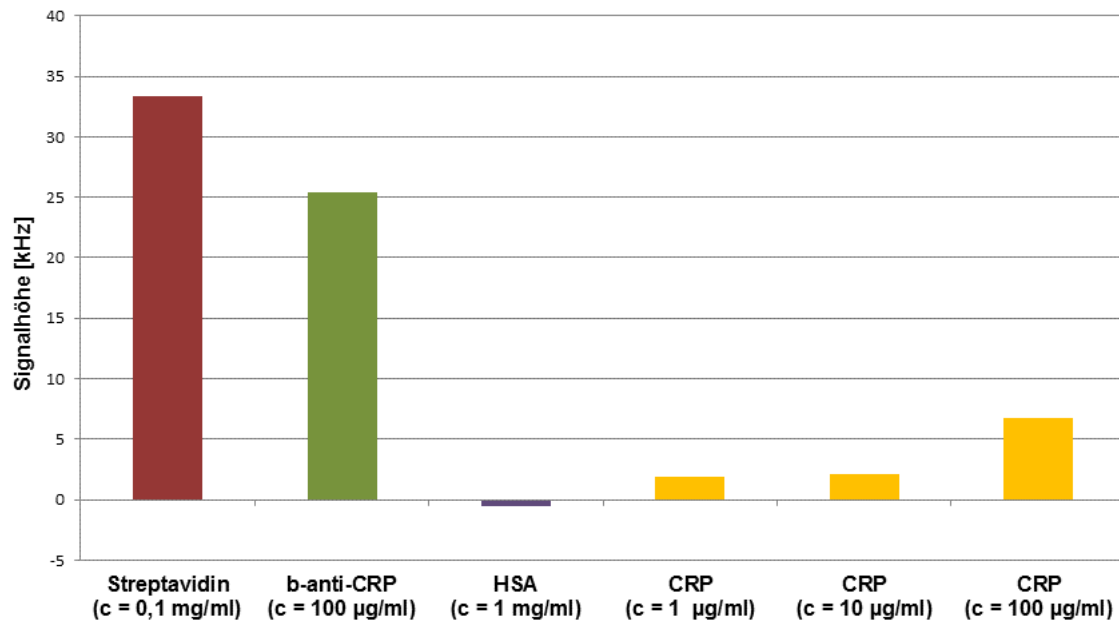


Abbildung 4.10: Erster CRP-Assay

Das CRP-Signal ist relativ niedrig. Dies liegt vermutlich daran, dass dem Masseffekt der Effekt der Viskoelastizität entgegen wirkt. Da man höhere CRP-Signale haben möchte, wurde für die nächste Messung die Konzentration vom b-anti-CRP um den Faktor 10 heruntergesetzt, also zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml. Damit soll die Einwirkung der Viskoelastizität auf den Masseffekt reduziert oder aber auch ganz eliminiert werden.

### 4.3.3 Zweiter CRP-Assay

Beim zweiten CRP-Assay wurde eine Streptavidin-Konzentration von 0,1 mg/ml und eine b-anti-CRP-Konzentration von 10 µg/ml für die sensitive Erkennungsschicht verwendet (s. Tab. 4.1).

In Abbildung 4.11 ist zu erkennen, dass beim CRP sowohl bei der CRP-Probe mit einer Konzentration von 10 µg/ml, als auch bei der CRP-Probe mit der Konzentration 100 µg/ml ein Ioneneffekt auftritt (s. Abschnitt 4.3.2). Die CRP-Probe mit einer Konzentration von 10 µg/ml zeigt auch den gleichen reversiblen Effekt, der über das Ausgangsniveau hinaus läuft. Die CRP-Probe mit einer Konzentration von 100 µg/ml läuft nicht wieder zum Ausgangsniveau zurück. Die Nullprobe und die CRP-Probe mit einer Konzentration von 1 µg/ml zeigen keine Signaländerung, sondern lediglich eine leichte negative Drift. Die CRP-Proben werden im Bereich zwischen 360-420 s ausgewertet.

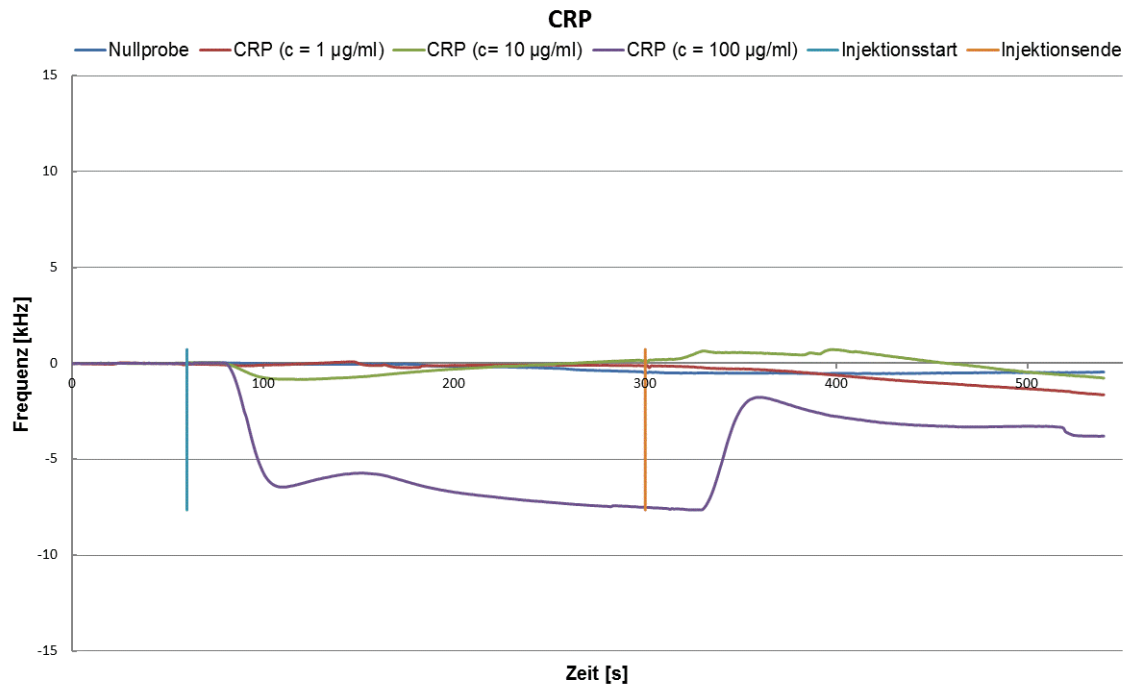


Abbildung 4.11: CRP-Kurvenverläufe aus dem zweitem CRP-Assay

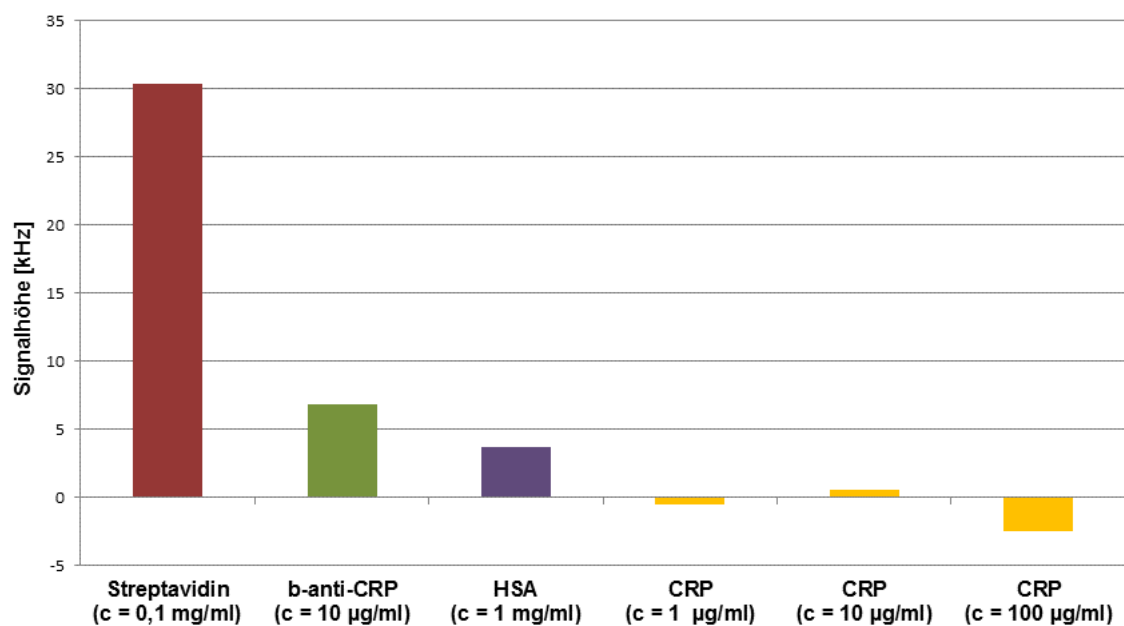


Abbildung 4.12: Zweiter CRP-Assay

In Abbildung 4.12 sind die jeweiligen Signalhöhen des zweiten CRP-Assays in einem Balkendiagramm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Streptavidin wieder sehr gut bindet, mit einer Signalhöhe von 30,3 kHz. Das b-anti-CRP-Signal beträgt 6,8 kHz. Die Abschirmung gegen HSA hat weniger gut funktioniert, das HSA-Signal beträgt 3,6 kHz.

Es wurde nur die erste HSA-Probe ausgewertet (s. Abschnitt 4.3.2). Das CRP-Signal beträgt -0,5 kHz bei einer Konzentration von 1 µg/ml. Der negative Wert entsteht durch eine zusätzliche leichte negative Drift. Die CRP-Probe mit einer Konzentration von 10 µg/ml zeigt eine Signalthöhe von 1,5 kHz. Das CRP-Signal bei einer Konzentration von 100 µg/ml beträgt -2,5 kHz. Der negative Wert entsteht möglicherweise dadurch, dass der Effekt der Viskoelastizität dem Masseffekt so stark entgegen wirkt, dass keine positiven Signale erhalten werden. Es kann jedoch keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob CRP auf der Oberfläche gebunden hat, da es auch zusätzliche Drift sein kann.

Da man in diesem Assay keine Aussage darüber treffen kann, ob CRP gebunden hat, da der Effekt der Viskoelastizität den Masseffekt überwiegt und auch die Abschirmung gegen HSA im Vergleich zum vorherigen CRP-Assay (s. Abschnitt 4.2.1) eher schlecht abgeschnitten hat, wird die Konzentration von Streptavidin von 0,1 mg/ml auf 0,05 mg/ml herabgesetzt und die b-anti-CRP Konzentration von 10 µg/ml beibehalten. Damit soll zunächst erreicht werden, die Einwirkung der Viskoelastizität auf den Masseffekt zu reduzieren oder aber auch ganz zu eliminieren.

#### 4.3.4 Dritter CRP-Assay

Beim dritten CRP-Assay wurde eine Streptavidin-Konzentration von 0,05 mg/ml und eine b-anti-CRP-Konzentration von 10 µg/ml für die sensitive Erkennungsschicht verwendet (s. Tab. 4.1).

Bei diesem Assay sahen die Kurven der CRP-Proben vergleichbar, mit denen des ersten CRP-Assays in Abbildung 4.9 (s. Abschnitt 4.3.2) aus und sind daher hier nicht abgebildet.

In Abbildung 4.13 sind die jeweiligen Signalthöhen des dritten CRP-Assays in einem Balkendiagramm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Anbindung von Streptavidin an die SB-PEG-Schicht weiterhin sehr gut ist, mit einer Signalthöhe von 33,5 kHz. Das b-anti-CRP-Signal beträgt 12,2 kHz. Die Abschirmung gegen HSA hat weniger gut funktioniert, das HSA-Signal beträgt 2,5 kHz. Es wurde wieder nur die erste HSA-Probe ausgewertet (s. Abschnitt 4.3.2). Die Signalthöhe des CRPs beträgt 0,5 kHz bei einer Konzentration von 1 µg/ml, 1,5 kHz bei einer Konzentration von 10 µg/ml und 3,2 kHz bei einer Konzentration von 100 µg/ml. Die CRP-Signale sind relativ niedrig. Dies liegt vermutlich auch hier daran, dass dem Masseffekt der Effekt der Viskoelastizität entgegen wirkt. Das Signal bei der CRP-Probe mit einer Konzentration von 1 µg/ml rührt aufgrund des Kurvenverlaufs eher von einer Drift als davon, dass sich CRP an der Oberfläche angelagert hat.

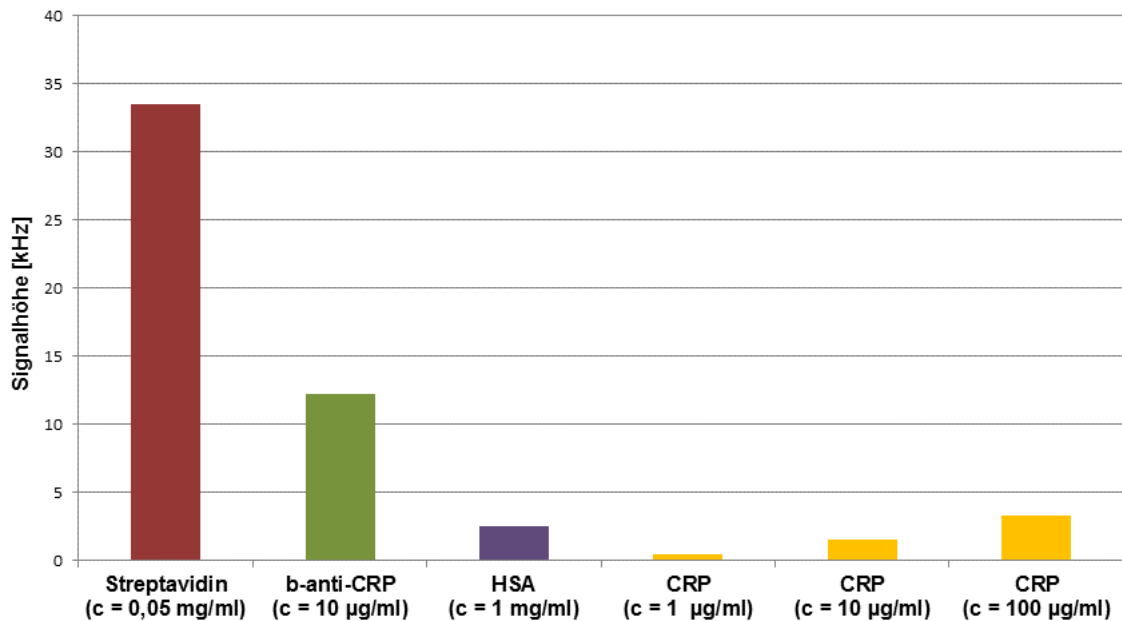


Abbildung 4.13: Dritter CRP-Assay

Da das Signal des Streptavidins gleich geblieben ist, sich aber die Abschirmung der Schicht gegen HSA verschlechtert hat, wird die Konzentration von b-anti-CRP im nächsten Schritt wieder um Faktor 10 erhöht, da sich im ersten CRP-Assay (s. Abschnitt 4.3.2) gezeigt hat, dass dort die Abschirmung hervorragend war. Zudem wird beim CRP eine andere Stammlösung (Konzentrationen und Volumen der Proben s. Abschnitt 3.2), welche bereits höher konzentriert vorliegt, eingesetzt, da die andere Stammlösung ( $c = 200 \mu\text{g/ml}$ ) bereits vollständig aufgebraucht worden war.

#### 4.3.5 Vierter CRP-Assay

Beim vierten CRP-Assay wurde eine Streptavidin-Konzentration von 0,05 mg/ml und eine b-anti-CRP-Konzentration von 100 µg/ml für die sensitive Erkennungsschicht verwendet (s. Tab. 4.1).

In Abbildung 4.14 ist zu erkennen, dass sich sowohl CRP mit einer Konzentration von 10 µg/ml auf der Oberfläche angelagert hat, als auch CRP mit einer Konzentration von 100 µg/ml. Zudem tritt hier kein Ioneneffekt (vgl. Abschnitt 4.3.2) auf. Dies liegt daran, dass hier eine bereits höher konzentrierte Stammlösung (Konzentrationen und Volumen der Proben s. Abschnitt 3.2) eingesetzt wurde, so dass der Probenhintergrund in der Messung dem Trägermedium ähnlicher ist. Nullprobe und die CRP-Probe mit einer Konzentration von 1 µg/ml zeigen lediglich eine leichte negative Drift. Die CRP-Proben werden im Bereich zwischen 360-420 s ausgewertet.

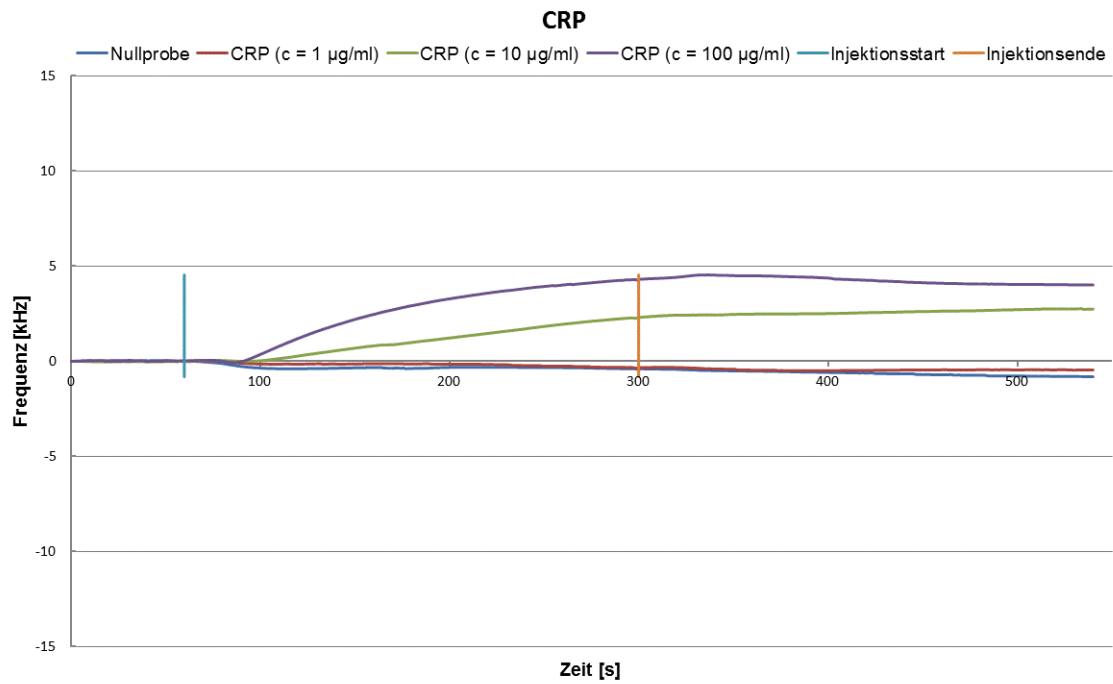


Abbildung 4.14: CRP-Kurvenverläufe aus dem vierten CRP-Assay

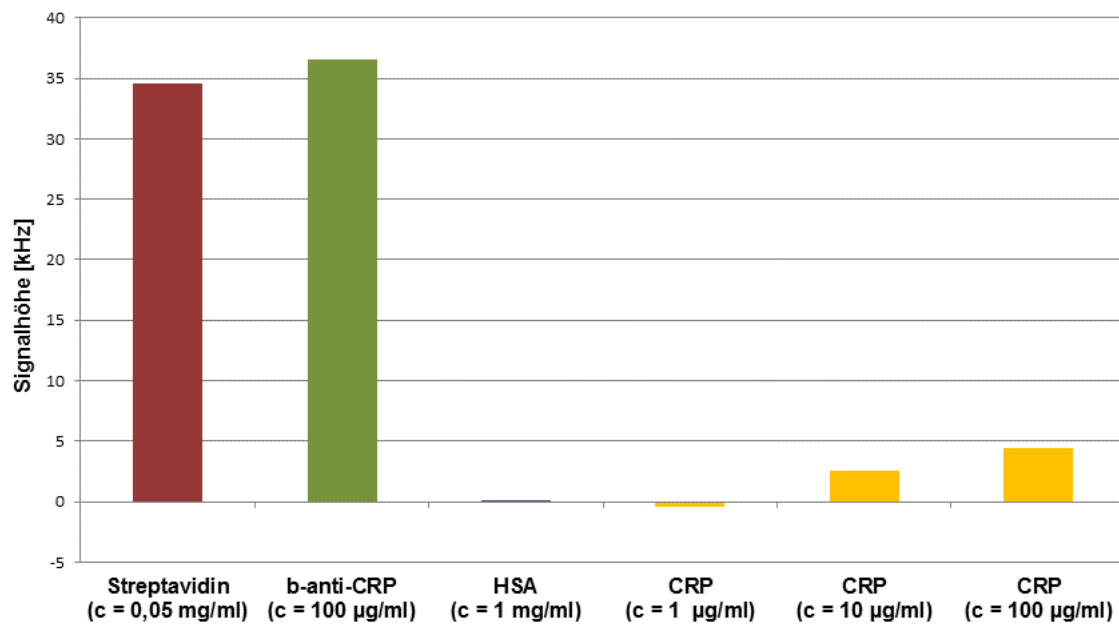


Abbildung 4.15: Vierter CRP-Assay



In Abbildung 4.15 sind die jeweiligen Signalhöhen des vierten CRP-Assays in einem Balkendiagramm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Anbindung von Streptavidin wieder ein sehr gutes Signal zeigt, mit einer Signalhöhe von 34,6 kHz. Das b-anti-CRP-Signal beträgt 36,6 kHz. Die Abschirmung der Schicht gegen HSA sieht hervorragend aus, es hat kein HSA gebunden. Das CRP-Signal beträgt -0,05 kHz bei einer Konzentration von 1 µg/ml. Das heißt, es hat sich kein CRP angelagert. Der negative Wert entsteht durch eine leichte negative Drift. Die CRP-Probe mit einer Konzentration von 10 µg/ml zeigt eine Signalhöhe von 2,5 kHz und die CRP-Probe mit einer Konzentration von 100 µg/ml zeigt eine Signalhöhe von 4,4 kHz. Die CRP-Signale sind immer noch gering. Vermutlich wirkt hier immer noch der Effekt der Viskoelastizität dem Masseeffekt entgegen.

Im Folgenden werden alle vier CRP-Assays noch einmal gegenübergestellt und verglichen.

#### 4.3.6 Vergleich

Der erste CRP-Assay hat schon ganz gut funktioniert. Er zeigt eine sehr gute Abschirmung der Schicht gegen HSA und anschließend ein gutes CRP-Signal bei den Konzentrationen 10 µg/ml und 100 µg/ml. Weniger gut hat im Vergleich zum ersten der zweite CRP-Assay funktioniert. Die Abschirmung der Schicht gegen HSA war schlechter als zuvor. Zudem konnte kein CRP nachgewiesen werden, vermutlich aufgrund des Effekts der Viskoelastizität. Der dritte CRP-Assay hat wieder etwas besser funktioniert, wenn auch eine etwas schlechtere Abschirmung der Schicht gegen HSA als im ersten CRP-Assay vorliegt. Dadurch wird trotzdem ein gutes CRP-Signal mit den Konzentrationen 10 µg/ml und 100 µg/ml erhalten. Der vierte CRP-Assay hat auch gut funktioniert, da er eine sehr gute Abschirmung der Schicht gegen HSA und anschließend ein gutes CRP-Signal mit den Konzentrationen 10 µg/ml und 100 µg/ml zeigt. Man kann somit sagen, dass der erste und der vierte CRP-Assay am besten funktioniert haben. Beim ersten CRP-Assay hat man ein geringfügig besseres CRP-Signal. Der vierte CRP-Assay hingegen wäre kostengünstiger, da man weniger Streptavidin zur Immobilisierung auf der SB-PEG-Schicht braucht. In beiden Fällen ist noch die Reproduzierbarkeit der Schichten zu zeigen.

Somit wurde das Ziel erreicht, CRP mit HSA im Probenhintergrund mit dem neuen Hydrogel SB-PEG nachzuweisen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenmodifikation mit SB-PEG an einem diagnostisch relevanten Beispiel (hier: Nachweis des Entzündungsmarkers CRP) funktioniert hat und damit der Entzündungsmarker CRP im physiologisch relevanten Bereich von 10 µg/ml (Schwellwert) und deutlich höheren Konzentrationen nachgewiesen werden kann.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, CRP mit HSA im Probenhintergrund im physiologisch relevanten Bereich (10 µg/ml) mit einem SAW-Biosensor nachzuweisen. Dazu wurde zur Beschichtung das neue Hydrogel SB-PEG verwendet, da es sich bereits in einer früheren Arbeit (s. Praktikumsbericht „Eignung von Polymeren zur Herstellung von Biosensorchips“) bewährt hat. Damit wurden vier CRP-Assays durchgeführt, wobei sich herausstellte, dass der erste und vierte CRP-Assay am besten funktioniert haben. Beide zeichnen sich durch eine hohe Anbindung von Streptavidin und b-anti-CRP aus, sowie eine sehr gute Abschirmung gegen HSA. Anschließend zeigen sie beide ein gutes CRP-Signal bei einer Konzentration von 10 µg/ml und bei einer Konzentration von 100 µg/ml. Der Unterschied zwischen dem ersten und vierten CRP-Assay liegt lediglich darin, dass der erste CRP-Assay ein etwas besseres CRP-Signal bei einer Konzentration von 100 µg/ml als beim vierten CRP-Assay gezeigt hat und dafür der vierte CRP-Assay kostengünstiger ist, da weniger Streptavidin zur Immobilisierung auf der SB-PEG-Schicht benötigt wird. Zwar hat der dritte CRP-Assay auch funktioniert, allerdings war hier die Abschirmung der Schicht gegen HSA nicht besonders gut.

Somit konnte mit dem neuen Hydrogel SB-PEG der Entzündungsmarker CRP im physiologisch relevanten Bereich von 10 µg/ml (Schwellwert) und deutlich höheren Konzentrationen nachgewiesen werden.

### 5.2 Ausblick

Aufgabe für zukünftige Arbeiten wird sein alle Ergebnisse auf Reproduzierbarkeit zu testen. Zudem müssen noch Nachweise mit realen Humanserumproben durchgeführt werden.

Die nachgewiesenen CRP Konzentrationen lagen im Rahmen dieser Arbeit bei 10 µg/ml und 100 µg/ml. Ziel sollte es in Zukunft sein, auch geringere Konzentrationen nachweisen zu können, da schon eine leicht erhöhte CRP-Konzentration (> 6 µl/ml) auf z. B ein erhöhtes Herzinfarktrisiko hinweisen kann. So könnte man dann auch einen Schnelltest für SAW-Biosensoren entwickeln. Es sollten also noch weitere CRP-Tests mit verschiedenen Konzentrationsreihen durchgeführt werden. Gegebenfalls müssen Optimierungen am Beschichtungsprotokoll bzw. Messprotokoll vorgenommen werden.

Da mit dem neuen Hydrogel SB-PEG CRP in HSA als Probenhintergrund nachgewiesen werden konnte bietet dies eine hervorragende Ausgangsposition für die Herstellung

von Biosensorchips, da das SB-PEG ein schonenderes Verfahren in Bezug auf verwendbare Kunststoffe für einen Biosensorchip darstellt. Somit könnten in Zukunft Biosensorchips hergestellt werden, die zu Arrays zusammengeschlossen werden können und so schnellere Ergebnisse für die Diagnostik liefern.

## Literaturverzeichnis

- [Albrecht et al., 2008] Albrecht, Käppel & Gauglitz (2008) Two immunoassay formats for fully automated CRP detection in human serum, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:1845-1852
- [Arnau, 2008] Arnau (2008) *Piezoelectric Transducers and Applications*, Springer, 2. Auflage
- [Bogue, 2005] Bogue (2005) Developments in biosensors - where are tomorrow's markets?, *Sensor Review* 25:180-184
- [Curie & Curie, 1880] Curie & Curie (1880) An oscillating quartz crystal mass detector, *Comp Rend* 91:294-297
- [Detjens, 2012] Detjens (2012) Nachweis von C-reaktivem Protein (CRP) in Humanserum mit einem Biosensor, Bachelorarbeit am Institut für Mikrostrukturtechnik am Karlsruher Institut für Technologie
- [Gabay & Kushner, 1999] Gabay & Kushner (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *The New Journal of Medicine* 340:448-454
- [Gruhl, 2010] Gruhl (2010) *Oberflächenmodifikation von Surface Acoustic Wave (SAW) Biosensoren für biomedizinische Anwendungen*, Doktorarbeit am Institut für Mikrostrukturtechnik am Karlsruher Institut für Technologie, ISBN: 978-3-86644-543-7
- [Gruhl et al., 2013] Gruhl, Rapp & Länge (2013) Biosensors for Diagnostic Applications, *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 133:115-148
- [Länge et al., 2003] Länge, Voigt & Rapp (2003) Surface acoustic wave biosensors for biomolecular interaction analysis, *Proceedings of IEEE Sensors* 2:1174-1178
- [Länge et al., 2006] Länge, Blaess, Voigt, Götzen & Rapp (2006) Integration of surface acoustic wave biosensor in a microfluidic polymer chip, *Biosensors and Bioelectronics* 22: 227-232

- [Länge et al., 2008] Länge, Rapp & Rapp (2008) Surface acoustic wave biosensors: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:1509-1519
- [Lee et al., 2008] Lee, Kim, Cho, Joeng & Jeon (2008) Binding behavior of CRP and anti-CRP antibody analyzed with SPR and AFM measurement, *Ultramicroscopy* 108:1374-1378
- [Matern, 2009] Matern (2009) Nachweis von C-reaktivem Protein (CRP) mit einem Biosensor auf der Basis akustischer Oberflächenwellen (surface acoustic wave, SAW); Diplomarbeit am Forschungszentrum Karlsruhe
- [Ngongang, 2012] Ngongang (2012) Berufspraktische Phase, Praktikumsbericht am Institut für Mikrostrukturtechnik am Karlsruher Institut für Technologie
- [Rapp, 2009] Rapp (2009) Entwicklung eines Biosensorarray-Systems auf der Basis von akustischen Oberflächenwellensensoren mit integrierter einwegtauglicher Mikrofluidik, Doktorarbeit am Institut für Mikrostrukturtechnik am Karlsruher Institut für Technologie, ISBN: 978-3-86644-318-1
- [Rapp et al., 2010] Rapp, Gruhl & Länge (2010) Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 298:2403-2412
- [Ridker et al., 1998] Ridker, Buring, Shih, Matias & Hennekens (1998) Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among healthy women, *Circulation* 98:731-733
- [Shrive et al., 1996] Shrive, Cheetham, Holden, Myles, Turnell, Volanakis, Pepys, Bloomer & Greenhough (1996) Three dimensional structure of human C-reactive protein, *Nature Structural Biology* 3:346-354
- [Tillet & Francis, 1930] Tillet & Francis (1930) Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus, *Journal of Experimental Medicine* 52:561-571
- [Volanakis, 2001] Volanakis (2001) Human C-reactive protein: expression, structure, and function, *Molecular Immunology* 38:189-197

- [Volanakis & Kaplan, 1971] Volanakis, Kaplan (1971) Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide, *Experimental Biology and Medicine* 136:612-614
- [Wagner, 2014] Wagner (2014) Eignung von Polymeren zur Herstellung von Biosensorchips, Praktikumsbericht am Institut für Mikrostrukturtechnik am Karlsruher Institut für Technologie
- [URL-1] (Zugriff: 17/07/2014) [http://flexikon.doccheck.com/de/C-reaktives\\_Protein](http://flexikon.doccheck.com/de/C-reaktives_Protein)
- [URL-2] (Zugriff: 17/07/2014) [http://www.imaco-gmbh.com/produkte/CRP\\_Handzettel.pdf](http://www.imaco-gmbh.com/produkte/CRP_Handzettel.pdf)





## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Mittweida, 31. August 2014